

(51)Int.Cl.*	識別記号	庁内整理番号	F I
C 1 2 P 21/08		9161-4B	
C 0 7 K 16/00		8318-4H	
16/18		8318-4H	
16/32		8318-4H	
		9050-4B	
		C 1 2 N 15/ 00	Z N A A

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求(全 17 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平6-514437  
 (86)(22)出願日 平成5年(1993)12月10日  
 (85)翻訳文提出日 平成6年(1994)8月11日  
 (86)国際出願番号 PCT/US93/12039  
 (87)国際公開番号 WO94/13806  
 (87)国際公開日 平成6年(1994)6月23日  
 (31)優先権主張番号 990, 263  
 (32)優先日 1992年12月11日  
 (33)優先権主張国 米国 (US)  
 (81)指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, M C, NL, PT, SE), AU, CA, JP

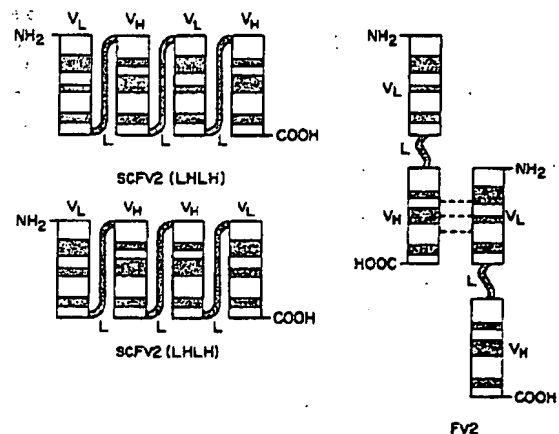
(71)出願人 ザ ダウ ケミカル カンパニー  
 アメリカ合衆国, ミシガン 48640, ミッドランド, アボット ロード, ダウ センター 2030  
 (72)発明者 メセス, ビーター エス.  
 アメリカ合衆国, コネチカット 06371, オールドライム, シル レーン 25  
 (72)発明者 ゴーリー, ブライアン ビー.  
 アメリカ合衆国, ミシガン 48640, ミッドランド, オーチャード ドライブ 3713  
 (74)代理人 弁理士 石田 敦 (外3名)

(54)【発明の名称】 多価の一本鎖抗体

(57)【要約】

本発明は、2以上の生物学的に活性な抗原結合部位を有する多価の一本鎖抗体を開示する。この多価の一本鎖抗体は、2本以上の一本鎖抗体を共有結合させるペプチドリンカーを用いることによって作った。各一本鎖抗体は、ペプチドリンカーにより、可変重鎖ドメインに連結されている可変軽鎖ドメインを有する。

共有及び非共有結合型一本鎖Fv多量体の図解



特許(内容に変更なし)

## 請求の範囲

1. 2以上の一本鎖抗体フラグメントを含んで成り、各フラグメントが抗原に対する親和性を有しており、ここでそのフラグメントは第一のペプチドリンカーにより共有結合されており、そして各フラグメントは:

(a) 軽鎖可変ドメインを含んで成る第一ポリペプチド;

(b) 重鎖可変ドメインを含んで成る第二ポリペプチド; 及び

(c) この第一と第二のポリペプチドを機能的な結合性成分へと連結せしめる第二のペプチドリンカー;

を含んで成る、多価の一本鎖抗体。

2. この第一のペプチドリンカーが下記のアミノ酸配列

Leu Ser Ala Asp Asp Ala Lys Lys Asp Ala Ala Lys Lys Asp Asp Ala Lys Lys Asp Asp Ala Lys Lys  
Asp Leu

を有する、請求項1記載の多価の一本鎖抗体。

3. この軽鎖可変領域が、図3に示すものと実質的に同じアミノ酸配列を有しており、そしてこの重鎖可変領域が、図5に示すものと実質的に同じアミノ酸配列を有している、請求項1記載の多価の一本鎖抗体。

4. この第一と第二のペプチドリンカーが実質的に同じアミノ酸配列を有する、請求項1記載の多価の一本鎖抗体。

5. 多価の一本鎖抗体をコードするDNA配列であって、この多価の一本鎖抗体が2以上の一本鎖抗体フラグメントを含んで成り、各フラグメントが抗原に対する親和性を有しており、ここでそれらのフラグメントは第一のペプチドリンカーにより共有結合されており、そして各フラグメントは:

(a) 軽鎖可変ドメインを含んで成る第一ポリペプチド;

特許(内容に変更なし)

## 明細書

## 多価の一本鎖抗体

本発明は一本鎖の多価抗体に関する。

抗体は、身体が外来物であると判断する特定の抗原又は物質に反応して免疫系により誘発されるイムノグロブリンの群に属するタンパク質である。5クラスのヒト抗体があり、各クラスは同一の基本構造を有している。抗体の基本構造は四量体、又はその複合体であり、軽鎖と重鎖とよりそれぞれが構成される二つの同一のヘテロダイマーより成る。軽鎖は一本の可変(V)ドメインと一本の定常(C)ドメインとより成り、他方、重鎖は一本の可変性ドメインと、3本以上の定常ドメインとより成る。軽鎖及び重鎖の両者に由来する、それぞれV<sub>L</sub>及びV<sub>H</sub>と称される可変ドメインは、イムノグロブリンの特異性を決定し、他方、定常(C)ドメインは様々なエフェクター機能をもたらす。

アミノ酸配列データは、それぞれの可変ドメインが、4つの比較的保存されたフレームワーク領域(FR)によりフラックされている3つの相補性決定領域(CDR)を含んで成ることを示唆する。このFRは可変領域ドメインの構造保全性を維持するものと考えられている。このCDRは個々の抗体の結合特異性にとって重要であり、且つ抗体の結合の多様性の原因であると推定されている。

抗体の基本構造は2本のヘテロダイマーを含むため、抗体は多価分子である。例えば、IgGクラスは2つの同一の抗原結合部位を有しており、他方、五量体IgMクラスは10の同一の結合部位を有している。

同一の遺伝系列及び結合特異性を有するモノクローナル抗体は診

(b) 重鎖可変ドメインを含んで成る第二ポリペプチド; 及び

(c) この第一と第二のポリペプチドを機能的な結合性成分へと連結せしめる第二のペプチドリンカー;

を含んで成る、DNA配列。

6. この第一のポリペプチドをコードする配列が図2のそれと実質的に同じであり、そして第二のポリペプチドをコードする配列が図3のそれと実質的に同じである、請求項5記載のDNA配列。

断及び治療剤の両方として有用とされている。モノクローナル抗体は、確立された手順に従い、マウスのリンパ球と適当なマウスミエローマ細胞系との融合により作られたハイブリドーマにより日常的に産出される。しかしながら、ヒトにおけるインビボ治療及び診断に於けるネズミ抗体の投与は、ヒト免疫系により誘発されるヒト抗マウス抗体応答に基づき制約されている。

キメラ抗体であって、一の種に由来する抗体の結合又は可変領域が別の種に由来する抗体の定常領域と組合されたものが組換えDNA方法論により作られている。例えば、Sahagenら、J. Immunol., 137: 1068-1074 (1986); Sunら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 214-218 (1987); Nishimuraら、Cancer Res., 47: 999-1005 (1987); 及び Lieら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84: 3439-3443 (1987)を参照のこと。これらは腫瘍関連抗原に対するキメラ抗体を開示している。典型的には、ネズミ抗体の可変領域はヒト抗体の定常領域に連結されている。かかるキメラ抗体はその組成において大部分がヒトであるため、それらはネズミ抗体よりも免疫原性が実質的に低いものと予測される。

キメラ抗体は、抗原結合にとって必須でないが、その薬理動力学に影響を及ぼすタンパク質構造全体のうちの主要部分を構成するFc領域を保有し続けている。免疫療法又は免疫診断における抗体の利用のため、標的組織に迅速に集中し、且つ結合する抗体分子を得ること、及び未結合の物質が身体から迅速に排除されることが所望される。一般に、小さめの抗体フラグメントは高めの毛管浸透性を有しており、そして完全抗体よりも身体からより早く排除される。

抗原と相互作用するのは軽鎖及び重鎖の可変領域であるため、一本のV<sub>L</sub>と一本のV<sub>H</sub>とにより一本鎖抗体フラグメント(scFvs)が作られており、これは8つのCDRを含み、それらはペプチドリンカ

ー(米国特許第 4,946,778号)により連結された $V_L-L-V_L$ 。ポリペプチドを成しており、ここではペプチドリンカーを表している。 $V_L$ と $V_H$ ドメインが配向 $V_H-L-V_L$ であるscFvが米国特許第 5,192,405号に開示されている。

完全抗体にとっての最少限の2つの結合部位と比べてscFvは一つのそれを有するため、scFvは2以上の結合部位を含む抗体に比べて低い活性を有している。

従って、このポリペプチドの活性を高めるため、且つその抗原認識特性を維持又は高めるため、複数の結合部位を有するscFvの構築体を得ることが有利であろう。加えて、標的組織上の別々のエピトープの認識を可能とする、別の免疫エフェクター機能の抗体ベースを増強を可能とする、又は治療もしくは診断成分の抗体構築を可能とする二価特異的である多価scFvを得ることが有利であろう。

それぞれ第一ペプチドリンカーにより共有結合している一本の $V_L$ と一本の $V_H$ ドメインとを有する一本鎖抗体フラグメントは、第二ペプチドリンカーによって共有結合されて、完全抗体の結合親和力を維持している多価一本鎖抗体を形成できることが発見された。一態様において、本発明は抗原に対する親和性を有する多価一本鎖抗体であり、ここでこの多価一本鎖抗体は2本以上の軽鎖可変ドメインと2本以上の重鎖可変ドメインとを含んで成り、ここで各可変ドメインは少なくとももう一つの別の可変ドメインに連結されている。

別の態様において、本発明は2本以上の一本鎖抗体フラグメントを含んで成る多価一本鎖抗体であり、各フラグメントは抗原に対する親和性を有しており、ここでこれらのフラグメントは第一ペプチドリンカーにより共有結合しており、そして各フラグメントは：

(a) 軽鎖可変ドメインを含んで成る第一ポリペプチド；

(b) 重鎖可変ドメインを含んで成る第二ポリペプチド；及び  
(c) この第一と第二のポリペプチドを機能的な結合性成分へと連結せしめる第二ペプチドリンカー；  
を含んで成る。

別の態様において、本発明は、多価一本鎖抗体をコードするDNA配列を提供し、ここでこの多価の一本鎖抗体は2本以上の一本鎖抗体フラグメントを含んで成り、各フラグメントは抗原に対する親和性を有しており、ここでこれらのフラグメントは第一ペプチドリンカーにより共有結合しており、そして各フラグメントは：

(a) 軽鎖可変ドメインを含んで成る第一ポリペプチド；

(b) 重鎖可変ドメインを含んで成る第二ポリペプチド；及び

(c) この第一と第二のポリペプチドを機能的な結合性成分へと連結せしめる第二ペプチドリンカー；  
を含んで成る。

この多価一本鎖抗体は、完全抗体の特異性及び活性を有するが、サイズにおいてもっと小さく、より迅速な毛管透過を可能とする抗体フラグメントの構築を可能とする。多価一本鎖抗体は、結合部位が2種類の抗原決定基でありうる多価一本鎖抗体の構築も可能とするであろう。

#### 図面の簡単な説明

図1は、 $V_L-L-V_H-L-V_L-L-V_H$  (LHLH)と $V_L-L-V_H-L-V_L-L-V_L$  (LHHL)の形態を有する共有結合型一本鎖抗体及び非共有結合型Fv一本鎖抗体(Fv2)を示す。

図2は CC49V<sub>L</sub> のヌクレオチド配列を示す。

図3は CC49V<sub>L</sub> のアミノ酸配列を示す。

図4は CC49V<sub>H</sub> のヌクレオチド配列を示す。

図5は CC49V<sub>H</sub> のアミノ酸配列を示す。

図6は p49LHLHにおけるCC49一本鎖抗体LHLHのヌクレオチド配列及びアミノ酸配列を示す。

図7は p49LHHLにおけるCC49一本鎖抗体LHHLのヌクレオチド配列及びアミノ酸配列を示す。

図8はプラスミド pSL301T及びpSL301HTの構築を示す。

図9はプラスミド p49LHLHの構築を示す。

図10はプラスミド p49LHLHの構築を示す。

図11はCC49IgG、CC49scFv2及びCC49scFvを用いた、競合因子としてビオチニル化 CC49IgGを用いる競合アッセイの結果を示す。

本明細書で挙げた全ての文献の教示全体を引用することで本明細書に組入れる。

核酸、アミノ酸、ペプチド、保護基、活性基等を略すとき、それらはIUPAC IUB (Commission on Biological Nomenclature) 又は関連分野の実際に従って略している。

本明細書で用いる「一本鎖抗体フラグメント」(scFv)又は「抗体フラグメント」なる語は、 $V_L-L-V_H$ により表わされる、ペプチドリンカー(L)により $V_H$ ドメインに連結された $V_L$ ドメインを含むポリペプチドを意味する。 $V_L$ と $V_H$ ドメインとの順序は逆であってよく、 $V_H-L-V_L$ として表わされるポリペプチドが獲得できうる。「ドメイン」は、独立の機能、例えば抗原結合又は抗原認識を及ぼすタンパク質のセグメントである。

「多価一本鎖抗体」はペプチドリンカーにより共有結合した2以上の一本鎖抗体フラグメントを意味する。この抗体フラグメントは連結されて、

$V_L-L-V_H-L-V_L-L-V_H$ ； $V_L-L-V_H-L-V_L-L-V_L$ ； $V_H-L-V_L-L-V_H-L-V_L$ ；

又は

$V_H-L-V_L-L-V_L-L-V_H$

の $V_L$ と $V_H$ ドメインの順序を有する二価の一本鎖抗体を形成してよい。

三価以上の一本鎖の多価抗体は、追加のペプチドリンカーによって二価の一本鎖抗体に連結された1又は数本の抗体フラグメントを有する。好適な態様においては、 $V_L$ と $V_H$ ドメインの数は等しい。

本発明は、

$V_H-L-V_H-L-V_L-L-V_L$ 又は $V_L-L-V_L-L-V_H-L-V_H$

で表示される多価の一本鎖抗体も提供する。

$V_L-L-V_H-L-V_L-L-V_H$  (LHLH) 及び $V_L-L-V_H-L-V_H-L-V_L$  (LHHL) の形態を有する共有結合型一本鎖抗体を図1に示す。非共有結合型Fv一本鎖抗体(Fv2)も図1に示している。

本発明において利用するための一本鎖抗体フラグメントは任意の抗体の軽鎖及び/又は重鎖可変ドメインに由来しうる。好ましくは、その軽鎖と重鎖可変ドメインは同一の抗原に特異的である。連結されて多価の一本鎖抗体を構成している個々の抗体フラグメントは、同一の抗原に対して特異的でありうるか、又は別々の抗原に対して特異的でありうる。

一本鎖の多価抗体についてのDNA配列を含むベクターを作るため、これらの領域をエンコードする遺伝子の起源が必要とされる。適切なDNA配列は公共の起源から入手するか、又は当業界に公知の標準の手順によって獲得できうる。例えば、The U.S. Department of Health and Human Services により公開された KabatらのSequences of Proteins of Immunological Interest 第4版(1991)は、今日まで述べられているほとんどの抗体可変領域の配列を開示している。遺伝子配列が未知のとき、ベクターの中にクローンするDNAの起

源として、逆転写酵素仲介合成によりmRNAから獲得したcDNA配列を利用することが一般に可能である。抗体に関して、mRNAの起源は広範囲にわたるハイブリドーマから獲得できる。例えば、カタログATCC Cell Lines and Hybridomas, American Type Culture Collection, 20309 Parklawn Drive, Rockville Md., USA (1990)を参照のこと。その中に挙げられている幅広い様々な抗原と反応性のモノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマがそのCollectionより入手でき、そして本発明において利用できる。これらの細胞系及びその他の類似の種類が、可変ドメインをコードするmRNAの起源として、又はモノクローナル抗体自体のアミノ酸配列を決定するために抗体タンパク質を獲得するように利用できよう。

抗体の可変領域は、適当な脊椎動物、通常は家畜動物とそして最も好都合にはマウスを免疫することにより得られもする。その抗原は課題の抗原であるか、又はハプテンであるとき、キーホールリンベットヘモシアニン(KLH)の如きの抗原に対するこのハプテンの抗原性複合体であろう。免疫化は宿主哺乳動物への通常は2〜3週間置きの免疫原の1又は数回の繰り返し注射によって好適に実施される。通常、最後の免疫の3日後、脾臓を取り出し、そしてmRNAが当業界に公知の標準手順により簡単に獲得できるようにハイブリドーマを供するための細胞融合に利用する単独細胞へと解離する。

課題の抗体が獲得でき、そしてそのアミノ酸配列だけを知り得たら、その配列を逆転写することが可能である。

本発明において有用なV<sub>L</sub>及びV<sub>H</sub>ドメインは好ましくは、1990年3月3日に公開されたPCT出願WO 90/04410及び1989年1月26日に公開されたPCT出願WO 89/00692に開示されている、腫瘍関連糖タンパク質72抗原に対する一連のCC抗体の一つから獲得できる。より好ましいのは、PCT公開WO 90/04410及びWO 89/00692に

する。

そのリンカーペプチドは抗体フラグメントに対して、その個々の抗体フラグメントへのこのリンカーの結合がその抗原認識部位の結合能力を妨害しないように付加されていることも必要である。

好適なリンカーは、PantolianoらのBiochem., 30, 10117-10125 (1991)に開示されている205Cと称されているヘリカルリンカーを基礎とするが、その最初と最後のアミノ酸は、一端にあるXhoI部位と、他端にあるHindIII部位により指定されるコドンで理由に換えられている。

好適なリンカーのアミノ酸配列(SEQ ID NO: 5)は下記の通りである：

Leu-Ser-Ala-Asp-Asp-Ala-Lys-Lys-Asp-Ala-Ala-Lys-Lys-Asp-Asp-Ala-Lys-Lys-Asp-Asp-Ala-Lys-Lys-Asp-Leu。

このリンカーは一般に10〜50のアミノ酸残基である。好ましくは、このリンカーは10〜30のアミノ酸残基である。より好ましくは、このリンカーは12〜30のアミノ酸残基である。最も好ましくは、このリンカーは15〜25のアミノ酸残基である。

本発明の分子の製造のための発現媒体にはプラスミド又はその他のベクターが含まれる。一般に、かかるベクターは宿主細胞と適合性種に由来するレプリコンとコントロール配列を含む。このベクターは通常レプリコン部位、及び形質転換細胞の中での表現型選別を供することのできる特定の遺伝子を保有している。例えば、大腸菌(E. coli)はpBR322を用いて容易に形質転換される(Bolivarら、Gene, 2, 95-(1977)又はSambrookら、Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Press, New York, 第2版(1989))。

真核細胞にとって適当なプラスミドも利用できる。S. セレビジエ(S. cerevisiae)又は一般のパン酵母が真核微生物の中で最も

においてCC49と表示されているモノクローナル抗体に由来するV<sub>L</sub>及びV<sub>H</sub>ドメインである。CC49のV<sub>L</sub>をコードするヌクレオチド配列(SEQ ID NO: 1)は図1に示すものと実質的に同じである。CC49のV<sub>L</sub>のアミノ酸配列(SEQ ID NO: 2)は図2に示すものと実質的に同じである。CC49のV<sub>H</sub>をコードするヌクレオチド配列(SEQ ID NO: 3)は図3に示すものと実質的に同じである。CC49のV<sub>H</sub>をコードするアミノ酸配列(SEQ ID NO: 4)は図4に示すものと実質的に同じである。

本発明の抗体フラグメント及び多価の一本鎖抗体を形成するため、適当なペプチドリンカーを得ることが必要である。V<sub>L</sub>とV<sub>H</sub>ドメインを連結するための適当なリンカーは、V<sub>L</sub>とV<sub>H</sub>ドメインが、一本鎖ポリペプチドであって完全抗体のものと構造に非常に類似する三次元構造を有し、従ってその抗体フラグメントが由来している完全抗体の結合特異性を保持しているポリペプチド鎖へと折りたたまれることを可能にするものである。scFvを連結するための適当なリンカーは、各イムノグロブリンフラグメントのV<sub>L</sub>及びV<sub>H</sub>ドメインが三次元構造であって、その各フラグメントが、そのイムノグロブリンフラグメントが由来している完全抗体の結合特異性を保持するような三次元構造を有するように、2以上のscFvを連結することの可能なものである。所望の特性を有するリンカーは、その開示内容を引用することで本明細書に組入れる米国特許第4,946,778号に開示の方法により獲得できる。この第4,946,778号に記載の方法により作られたポリペプチド配列より、ポリペプチドをコードする遺伝子配列が獲得できる。

好ましくは、V<sub>L</sub>とV<sub>H</sub>ドメインを連結してscFvを形成せしめるペプチドリンカーと、2以上のscFvを連結して多価の一本鎖抗体を形成せしめるペプチドリンカーとは実質的に同じアミノ酸配列を有

一般的に利用されているが、数多くのその他の株、例えばピシアバストリス(Pichia pastoris)が有用である。多細胞生物、例えばATCCより入手できるSP2/O又はチャイニーズハムスター卵巣に由来する細胞の培養物も宿主として利用できる。哺乳動物細胞にとって適当な典型的なベクタープラスミドはpSV2neo及びpSV2gpt(ATCC); pSVL及びpKSV-10 (Pharmacia), pBPV-1/pML2d (International Biotechnology, Inc.)である。

本発明のポリペプチドについての遺伝子を発現するための原核及び真核ウイルス発現ベクターの利用も考慮される。

この発現ベクター及びこの一本鎖の多価抗体をコードするインサートは、その挿入連結部において適合性制限部位を有し、且つその制限部位が挿入の領域にとって固有であることが好ましい。ベクター及びインサートの両者とも制限エンドヌクレアーゼにより処理し、次いで任意の様々な方法、例えばSambrookら、前掲に記載の方法によりリゲートする。

本発明の一本鎖の多価抗体の製造にとって好適なベクターの遺伝子構築体は、構成的に活性な転写プロモーター、新生一本鎖ポリペプチドの合成/細胞の外への分泌を誘導するシグナルペプチドをエンコードする領域を含むものである。好ましくは、その発現速度は、不溶性物質としてそのポリペプチドが蓄積することを避けるために輸送、折りたたみ及び集成過程とつり合う。レプリコン及びコントロール配列に加えて、一本鎖ポリペプチドの最適な合成にとって追加の要素が必要とされる。これらの要素にはスプライスシグナル、並びに転写プロモーター、エンハンサー、及び終止シグナルが含まれる。更に、追加の遺伝子及びその生成物が集成及び折りたたみを助長するために必要とされる(シャペロン)。

市販されているベクターはベクターにとって上記の基準を満たす

ように簡単に改変されうる。かかる改変は入手できる書物及び本明細書における教示により、当業者によって容易に実施される。

更に、このクローニングベクターは選択マーカー、例えば薬剤耐性マーカー、又は宿主細胞による選別できる特徴の発現を引き起こすその他のマーカーを含むことが好ましい。「宿主細胞」とは、組換えDNA技術を用いて構築されたベクターにより組換的に形質転換されうる細胞である。薬剤耐性又はその他の選択マーカーは形質転換の選別をある程度助長することを意図する。更に、選択マーカー、例えば薬剤耐性マーカーの存在は、夾雑微生物が培養培地の中で繁殖することを防ぐうえで利用されうる。この懸液において、かかる純粋な形質転換細胞の培養物は生存のために誘発された表現型を必要とする条件のもとで細胞を培養することにより得られるであろう。

本発明の回収及び精製は当業界に公知の標準技術を利用して達成されうる。例えば、もしそれらが培養培地の中に分泌されるなら、この一本鎖の多価抗体は限外濾過により濃縮されうる。そのポリペプチドが宿主細胞のペリプラズマ空間へと輸送されるなら、精製はその細胞に浸透圧ショックを与え、次いで限外濾過、抗原アフィニティークロマトグラフィー又はイオン交換クロマトグラフィーを用いるカラムクロマトグラフィー及びゲル濾過を実行することにより達成されうる。不溶性であり、且つ屈折体 (refractive bodies)、通称封入体として存在しているポリペプチドは、細胞の溶解、封入体を単離するための遠心と洗浄の繰り返し、例えばグアニジン-HClによる可溶化、及び再度の折りたたみ、それに続く生物活性分子の精製によって精製できうる。

一本鎖の多価抗体の活性は当業界に公知の標準アッセイ、例えば競合アッセイ、酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA) 及びラジオイムノアッセイ (RIA) により測定できうる。

IEF	等電点電気泳動
Kbp	キロ塩基対
LB	Luria-Bertani 培地
Mab	モノクローナル抗体
MES	2-(N-モルホリノ) エタンスルホン酸
MW	分子量
NBT	ニトロブルーテトラゾリウムクロリド
オリゴ	オリゴヌクレオチド
PAG	ポリアクリルアミドゲル
PAGE	ポリアクリルアミドゲル電気泳動
PBS	リン酸緩衝食塩水
PCR	ポリメラーゼ連鎖反応
pSCFV	SCPVをコードする DNA配列を含むプラスミド
RIGS	ラジオイムノガイド外科
RIT	ラジオイムノ治療
scFv	一本鎖Fvイムノグロブリンフラグメントモノマー
scFvs	共有結合した一本鎖Fvイムノグロブリンフラグメントダイマー
SDS	ドデシル硫酸ナトリウム
TBS	トリス緩衝食塩水
トリス	(トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン)
TTBS	ツイーン20洗浄液
V <sub>H</sub>	イムノグロブリン重鎖可変ドメイン
V <sub>L</sub>	イムノグロブリン軽鎖可変ドメイン

#### 抗体

CC49: ヒト腫瘍関連糖タンパク質72(TAG-72)に特異的なネズミモノクローナル抗体; ATCC No. HB9459として寄託。

本発明の多価の一本鎖抗体は診断及び治療における利用に固有の利点を供する。この多価の一本鎖抗体の利用は、大きめのフラグメント又は抗体分子全体の利用に勝る数多くの利点を供する。それらはその標的組織により迅速に到達し、そして身体からより迅速に排除される。

診断及び/又は治療用途のため、この多価の一本鎖抗体は1又は複数の抗体フラグメントが標的組織に対して特異的であるように、及び/又は複数の抗体フラグメントが診断もしくは治療因子に対して特異的であるように構築されうる。

本発明は更に、癌の如きの障害の診断及び/又は治療において有用な特に好都合な薬理組成物も考慮しており、ここでこの標的抗原はしばしば細胞の表層上で発現される。診断及び/又は治療用途のため、この多価の一本鎖抗体は適当なイメージ又は治療剤に当業界に公知の方法によって結合されうる。本発明の薬理組成物は当業界に公知の方法、例えば常用の混合、溶解又は凍結乾燥工程によって調製される。

本発明を、その単なる例示を意図する下記の実施例の考慮により更に明らかにする。

#### 略語

BCIP	5-ブロモ-4-クロロ-3-インドイルホスフェート
bp	塩基対
Bis-Trisプロパン	(1, 3-ビス (トリス (ヒドロキシメチル) -メチルアミノ) プロパン)
BSA	牛血清アルブミン
CDR	相補性決定領域
ELISA	酵素結合免疫吸着アッセイ
Fv2	非共有一本鎖Fvダイマー

CC49FAB: 重鎖のN-末端領域に連結している完全軽鎖より成るCC49の抗原結合性領域。

CC49scFv: ペプチドリッカーにより連結されているCC49抗体の二本の可変ドメインより成る一本鎖抗体フラグメント。

CC49Fv2: ダイマーを構成するように非共有結合している2つのCC49scFv。Fvの後ろの数字は、表示の分子のモノマーサブユニットの数を意味する。例えばCC49Fv6は六量体の多量体を意味する。

CC49scFv2: 3つのリンカーにより連結されている、2本のCC49V<sub>H</sub>ドメインと2本のV<sub>L</sub>ドメインとより成る共有結合型一本鎖抗体フラグメント。V<sub>H</sub>(L)とV<sub>H</sub>(H)ドメインとを連結し合わせるのに6つの可能な順序の組合せがある: LHLH, LHLH, LHLH, HLHL, HLHL及びHHLH。

#### プラスミド

pSCPV UHM: 25のアミノ酸リンカーにより連結されている、CC49の可変軽鎖とCC49可変重鎖とより成るscFvについてのコード配列を含むプラスミド。

p49LHLH 又は p49LHLH: CC49scFv2 LHLH又はLHLH生成物のそれぞれを生成するためのコード配列を含むプラスミド。

#### 実施例

##### 一般実験

分子クローニングのための手順は、その開示内容を引用することによって本明細書に組入れる。Sambrookら、Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Press, New York 第2版 (1989) 及び Ausubelら、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, New York (1992) に記載の手順である。

ここで用いた水は全て脱イオン蒸留水とした。

オリゴヌクレオチドの合成及び精製

オリゴヌクレオチド(オリゴ)は全て、標準の $\beta$ -シアノエチルホスホラミジット及び合成カラムを用い、Applied Biosystems (Foster City, CA) 由来のModel 380A又はModel 381 DNA合成装置のいずれかで合成した。その生成物上の保護基は、濃水酸化アンモニウムの中で55℃で8~15時間加熱することにより除去した。水酸アンモニウムはエバポレーションを介して除去し、そしてその粗混合物を30~40 $\mu$ lの滅菌水の中に再懸濁させた。ポリアクリルアミド-尿素ゲル上での電気泳動の後、オリゴを短波紫外(UV)光を用いて可視化させた。DNAバンドをゲルから切り出し、そして1mlの100mMのトリス-HCl, pH 7.4, 500mMのNaCl, 5mMのEDTAの中で65℃で2時間かけて溶解させた。最終精製は、DNAをSep-Pac(商標) C-18カラム(Millipore, Bedford, MA)に適用し、そして結合したオリゴを60%のメタノールで溶解させることによって行った。その溶液の体積を約50mlに下げ、そしてDNA濃度を260nm (OD<sub>260</sub>)での光学密度を測定することにより決定した。

制限酵素消化

制限酵素消化は全て、Bethesda Research Laboratories (Gaithersburg, MD), New England Biolabs, Inc. (Beverly, MA) 又はBoehringer Mannheim (BM, Indianapolis, IN)の酵素及び緩衝液を用い、その製造者の推奨する手順に従って実施した。消化させた生成物をポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE)により分離させた。そのゲルをエチジウムブロミドで染色し、そのDNAバンドを短波UV光により識別化させ、次いでそのDNAバンドを切り出した。そのゲルスライスを、5mMのトリス、2.5mMの酢酸、1mMのEDTA, pH 8.0を含む透析チューブ(Union Carbide Corp., Chicago)の中に入れ、そしてMax Submarine電気泳動装置(Hoefer Scientific Instruments,

より測定した。scFv2の結合は、発色の同時低下を伴うビオチニル化CC49の結合の低下をもたらした。

SDS-PAGE及びウェスタンブロッティング

SDS-PAGE分析のためのサンプル(20 $\mu$ l)を、非還元用サンプル調製バッファSepasol 1(Integrated Separation Systems(ISS), Natick, MA)の中で5分間煮沸することにより調製し、そして10~20%勾配のポリアクリルアミド Daiichi Minigellにその製造者の仕様書(ISS)に従って載せた。

電気泳動は、Mini 2-ゲル装置(ISS)を用い、ゲル当たり55mAで、一定の電流で約75分を行った。ゲルをクマジーブリアントブルーR-250 (Bio-Rad, Richmond, CA)の中で少なくとも1時間染色し、次いで脱色した。分子量標準品は予め染められており(Mid Range kit, Diversified Biochem, Newton Center, MA)、そして下記のタンパク質を含んでいた: ホスホリラーゼb、グルタマートデヒドロゲナーゼ、オバロブミン、ラクテートデヒドロゲナーゼ、炭酸アンヒドラーゼ、B-ラクトグロブリン及びチトクロームC。対応の分子量はそれぞれ95,000、65,000、43,000、36,000、29,000、18,400及び12,400である。

ウェスタン分析を行うとき、デュプリケートのゲルも泳動した。電気泳動後、ゲルの一方を陽極バッファ#1(0.3Mのトリス-HCl, pH10.4)の中で15~20分平衡にした。Immobilon-P-PVDF(ポリビニリデンジクロリン)膜(Millipore, Bedford, MA)をメタノールで2分処理し、そして水の中に2分浸した。その膜を次に陽極バッファ#1の中で3分平衡にした。Milliblot-SDE装置(Millipore)を、ゲルの中のタンパク質をこの膜に転写するために用いた。一層の陽極バッファ#1を陽極電極面の中央に載せた。Whatman 3MM濾紙のシートを陽極バッファ#1の中に浸し、そしてその電

CA)を用いて溶解させた。サンプル容量をSpeed Vac濃縮器(Savant Instruments, Inc., NY)で下げた。DNAをエタノール沈殿させ、そして滅菌水の中で再溶解させた。

酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)

Johnsonら, Can. Res., 46, 850-857 (1986)に実質的に記載の通りに調製したTAG-72抗原を、ポリビニルクロリド96穴マイクロタイタープレート(Dynatech Laboratories, Inc., Chantilly, VA)のウェルの上に一夜乾燥させることで吸着させた。そのプレートをPBS中の1%のBSAで31℃で1時間ブロックし、次いで200 $\mu$ lのPBS, 0.05%のツイーン50で3回洗った。25 $\mu$ lの試験抗体及び25 $\mu$ lのビオチニル化CC49(1/20,000希釈率の1mg/mlの溶液)をウェルに加え、そしてそのプレートを31℃で30分インキュベートした。プレートに結合したTAG-72、ビオチニル化CC49、ストレプトアビジンアルカリホスファターゼの相対量、及び発色時間は、余計な抗体又はビオチニル化CC49がないように、しかもscFvによる結合を検出するのに十分なシグナルが得られるように実験的に決定した。陽性コントロールは5 $\mu$ g/mlのCC49及び10 $\mu$ g/mlのCC49Fabとした。陰性コントロールはPBS中の1%のBSA及び/又は濃LBとした。未結合のタンパク質を洗い流した。アルカリホスファターゼの抱合された1:1000の希釈率のストレプトアビジン50 $\mu$ l(Southern Biotechnology Associates, Inc., Birmingham, AL)を加え、そしてそのプレートを31℃で30分インキュベートした。そのプレートを更に3回洗った。50 $\mu$ lのパラ-ニトロフェニルホスフェート溶液(Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc., Gaithersburg, MD)を加え、そして発色反応を最低20分行わせた。scFv2結合の相対量をマイクロプレートリーダー(Molecular Devices Corporation, Menlo Park, CA)を用い404~450 nmでの光学密度スキャンに

極面の上に滑らかに置いた。陽極バッファ#2(25mMのトリス, pH10.4)の中に浸した別の濾紙を一枚目の上に載せた。次に濡れたPVDF膜を加え、平衡ゲルをその上に載せ、そして最後に陽極バッファ#1(40mMのグリシン中の25mMのトリスHCl, pH9.4)の中に浸した濾紙のシートを加えることによってサンドイッチを作った。転写は250mMの定常電流(初期電圧は8~20ボルトに範囲した)を用いて30分で進められた。

プロットした後、その膜を水の中で簡単にすすぎ、そして20mlのブロッキング溶液(トリス緩衝食塩水(TBS)中の1%の牛血清アルブミン(BSA)(Sigma, St. Louis, MO))を有する皿の中に入れた。TBSはPierce Chemical (Rockford, IL)より、予備秤量粉末として購入し、500mlの水を加えたとき、その混合物は25mMのトリス、0.15Mの塩化ナトリウム溶液、pH 7.6を供する。これらの膜を最少限1時間、周囲温度でブロックし、そして20mlづつの0.5%のツイーン20洗浄液(TTBS)を用いて5分間3回洗った。TTBSを調製するには、0.5mlのツイーン20(Sigma)をTBSのリッター当り混合した。使用したプローブ抗体は20mlのビオチニル化FAID 14溶液とした(10 $\mu$ g/20mlの抗体バッファ)。抗体バッファは100mlのTTBS当たり1gのBSAを加えることにより作った。周囲温度で30~60分プローブした後、その膜を上記の通りTTBSで3回洗った。

次に、その膜を周囲温度において30~60分、抗体バッファの中で1:500希釈率のアルカリホスファターゼの抱合されたストレプトアビジン(Southern Biotechnology Associates, Birmingham, AL)20mlとインキュベートした。洗浄工程を上記の通り、この後繰り返した。発色反応の前に、膜を炭酸アルカリバッファ(20ml)の中で2分洗った。このバッファは0.1Mの炭酸水素ナトリウム、1mMのMgCl<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O, pH9.8とした。アルカリホスファターゼにとっ

ての基質を作るため、ニトロブルーテトラゾリウム(NBT)クロリド(50mg, Sigma)を70%のジメチルホルムアミドの中に溶かした。5-ブプロモ-4-クロロ-3-インドイルホスフェート(BCIP)(25mg, Sigma)を別に100%のジメチルホルムアミドの中に溶かした。5-ブプロモ-4-クロロ-3-インドイルホスフェート(BCIP)(25mg, Sigma)を別に100%のジメチルホルムアミドの中に溶かした。これらの溶液も、Promegaよりウェスタン発色剤として市販されている。発色のため、それぞれ120 $\mu$ lを上記のアルカリ溶液に加え、そして15分間反応させ、次いで発色液からそれらを水で洗い流した。

#### バイオニル化 FAID 14

FAID 14は、CC48に対して特異的な、ATCC No. CRL10256として寄託されているネズミの抗-イディオタイプ抗体(IgG2a, Kアイソタイプ)である。FAID 14をHygene Protein Aアフィニティーカラム(Yonkers, NY)を用いて精製した。製造者のプロトコールに従ったが、ただし溶離バッファーとして0.1Mのクエン酸ナトリウム、pH 3.0を用いた。画分を1.0Mのトリス-HCl pH 8.0を用いてpH 7に中和した。バイオニル化反応は下記の通りに設定した。FAID 14(1 $\mu$ g、水の中で100 $\mu$ l)を100 $\mu$ lの0.1MのNa<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>、pH 8.6と混合した。バイオニル化- $\epsilon$ -アミノ- $\alpha$ -カプロン酸N-ヒドロキシスクシニミドエステル(Biotin-X-NHS)(Calbiochem, LaJolla, CA)(2.5mg)を0.5mlのジメチルスルホキシドの中に溶かした。Biotin-X-NHS溶液(20 $\mu$ l)をFAID 14溶液に加え、そして22 $^{\circ}$ Cで4時間反応させた。過剰のバイオチン及び不純物を、Pharmacia Superose 12 HR10/30カラム(Piscataway, NJ)を用いてゲル濾過により除去した。0.8 $\mu$ l/minの流速で、バイオニル化FAID 14は16.8minのピークで出現した。このピークを構成する画分をプールし、そして4 $^{\circ}$ Cで保存し、そしてCC48V<sub>L</sub>及びV<sub>H</sub>CDRIにより決定

されるCC48イディオタイプを検出するのに用いた。

#### 等電点電気泳動(IEP)

等電点(pI)は、DNASTAR(Madison, WI)を介して入手できるPROTEIN-TITRATEという名のコンピュータープログラムを用いて推定した。入力してある配列によるアミノ酸組成に基づき、pIに加えてMW値が得られた。Cys残基は電荷に寄与するため、Cysについての計数は0に調整し、なぜならそれらは全てジスルフィド結合に関与するからである。

実験的にpIを、IsogelアガロースIEPプレート、pH域3~10(PMC Bioproducts, Rockland, ME)を用いて決定した。Biorad Bio-phoresis 水平電気泳動セルを、IEPを行うのに用い、両者の製造者の仕様書に従った。電気泳動条件は、500ボルト(限界)、20mAの電流及び10Wの定常電力とした。等電点泳動は80minで完了した。IEP標準品はBioradより購入した。そのキットはフィコシアニン、 $\beta$ -ラクトグロブリンB、牛炭酸アンヒドラーゼ、ヒト炭酸アンヒドラーゼ、馬ミオグロビンヒトヘモグロビンA及びC、3レンチルレクチン及びチトクロームCを含み、それらのpI値は4.65, 5.10, 6.00, 6.50, 7.00, 7.10及び7.50, 7.80, 8.00並びに8.20及び9.60である。ゲルを、PMCにより供給された仕様書に従って染色及び脱色した。

#### CC48抗体の定量

IgG, scFv2の種および単量体scFvを含む精製CC48抗体はすべて、適合している1.0cm光路長の石英製キュベット(Hellma社)およびPerkin-Elmer UV/VIS分光光度計552A型を用いて、タンパク質希釈液の280nm波長の吸光度を測定して定量した。モル吸光係数(E<sub>1</sub>)は、各抗体について、下記式を用いて算定した。

$$E_1 = (\text{Trp数}) \times 5,500 + (\text{Tyr数}) \times 1,340 + ((\text{Cys}) 2 \text{数}) \times 150 + (\text{Phe数}) \times 10$$

これらの値は、D. B. Watlafer, Advances in Protein Chemistry, 17巻、375~378頁に記載されている情報に基づいている。

#### 高性能液体クロマトグラフィー

CC48scFv2を精製するために行った高性能液体クロマトグラフィーにはすべて、全体にチタンまたはテフロン製配管を用いたLKB HPLCシステムを使用した。このシステムは、2150型HPLCポンプ、2152型制御器、276nmの吸光度に設定されたUV CORD S II 2238型検出装置および2211型SuperRac fraction collectorで構成されている。

#### サブユニットのPCRによる製造

ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)はすべて、150ピコグラム(pg)のプラスミド標的(pSCFVUHM)；100ピコモルのプライマー：1 $\mu$ lのPerkin-Elmer-Cetus社(米国、コネティカット州、ノーウォーク)のAmpli-Tagポリメラーゼ；16 $\mu$ lの10mM dNTPおよび10 $\mu$ lの10 $\times$ 緩衝液(両者ともにPECキットに提供されている)；ならびに合計容積を100 $\mu$ lにするのに十分な水で構成された反応混合物で行った。PCR反応はメーカーが記載しているのほとんど同様にして行った。これらの反応は、PEC 9600型サーモサイクラー(thermocycler)を用いて30サイクル行ったが、その1サイクルは、94 $^{\circ}$ Cで20~45秒間のDNAの変性；52~60 $^{\circ}$ Cで0.5~1.5分間のアニーリングおよび72 $^{\circ}$ Cで0.5~2.0分間の伸長で構成されている。オリゴヌクレオチドのプライマーは、Applied Biosystems社(米国、カリフォルニア州、ホスター・シティ所在)の380A型もしくは391型DNA合成器で合成し次いで上記のようにして精製した。

#### リゲーション

100ngのベクターDNAおよび対応する1:1化学量論的当量のインサートDNAを用いるリゲーション反応を、Stratagene社(米国、

カリフォルニア州、ラ・ホーヤ所在)のT4 DNAリガーゼキットを用い、該メーカーの指示にしたがって行った。リゲーション反応物(全容積20 $\mu$ l)は最初18 $^{\circ}$ Cでインキュベートし、次いで一夜4 $^{\circ}$ Cまで徐々に冷却した。

#### 形質転換

形質転換は、100 $\mu$ lのStratagene社の大腸菌(E. coli) AG1コンピテント細胞(米国、カリフォルニア州、ラ・ホーヤ所在のStratagene社)を用い、メーカーの指示によって行った。上記リゲーション反応物由来のDNA(1~5 $\mu$ l)を使用した。形質転換ステップの後、細胞は、混合を続けながらルリアブロス(LB)中で37 $^{\circ}$ Cで1時間再生させ、続いて、pSCFVUHM, p49LHLHもしくはp49LRLHに用いる20 $\mu$ g/mlのクロラムフェニコール含有(CAN20)ルリア寒天上にプレートし、またはプラスミドpSL301を含有するクローンもしくはpSL301由来のその後の構築物に用いる100 $\mu$ g/mlアンピシリン(AMP100)ルリア寒天プレート(LB-AMP100)上にプレートした。

#### 大腸菌クロウンのスクリーニング

細菌プラスミドは、Promega社(米国、ウィスコンシン州、マディソン所在)のMagicミニプレッププラスミド製造キットを用いて、淘汰圧(selection pressure)を維持するため適切な薬剤を含有するLBブロス培養物から単離した。このキットはメーカーの取扱い説明書にしたがって使用した。

#### プラスミドの構築

p49LHLHおよびp49LRLHと命名された2種のプラスミドを、多価の一本鎖抗体を製造するために構築した。p49LHLHを含有する宿主細胞は、V<sub>L</sub>-L-V<sub>H</sub>-L-V<sub>L</sub>-L-V<sub>H</sub>で変換することができるポリペプチドを産生した。ここでV<sub>L</sub>とV<sub>H</sub>はCC48抗体の軽鎖と重鎖の可変領域であり、およびリンカー(L)は、下記SEQ ID NO: 5の配列を有する

25個のアミノ酸のリンカーである。

Leu-Ser-Ala-Asp-Asp-Ala-Lys-Lys-Asp-Ala-Ala-Lys-Lys-Asp-Asp-Ala-Lys-Lys-Asp-Asp-Ala-Lys-Lys-Asp-Leu

p49LHHLを含有する宿主細胞は、 $V_L$ - $L$ - $V_H$ - $L$ - $V_L$ - $L$ - $V_L$ で表すことができるポリペプチドを産生した。ここで $V_L$ と $V_H$ はCC49抗体の軽鎖と重鎖の可変領域であり、およびしは上記アミノ酸配列を有するペプチドリンカーである。

CC49V $_L$ - $L$ - $V_H$ - $L$ - $V_L$ - $L$ - $V_L$ (p49LHHL)のヌクレオチド配列(SEQ ID NO: 6)とアミノ酸配列(SEQ ID NO: 7)を図6に示す。CC49V $_L$ - $L$ - $V_H$ - $L$ - $V_L$ - $L$ - $V_L$ (p49LHHL)のヌクレオチド配列(SEQ ID NO: 8)およびアミノ酸配列(SEQ ID NO: 9)を図7に示す。

#### pSL301HTの構築

pSL301HTの構築を図8に示す。バシラス・リヘニフォルミス(*Bacillus licheniformis*)のペニシリナーゼP (penP) ターミナーターの配列を、NheIおよびBamHIで45分間消化することによって、pSCFV UHMと命名されたプラスミドから取出し、電気泳動を行った後、4.5%ポリアクリルアミドゲルから切り取り、電気泳動させ、エタノールで沈降させ、次に、同様に製造されたベクター：pSL301 (米国、カリフォルニア州、サンディエゴ所在のInvitrogen社)中の同じ部位に連結した。pSCFV UHMの製造手順は、1992年8月21日付け出版の米国特許第07/935,695号に記載されている。なおこの出版の開示事項は本願に援用するものである。一般に、pSCFV UHMは、penPプロモーターのヌクレオチド配列；固有NcoI制限部位；CC49V $_L$ 領域；HindIII制限部位；25個のアミノ酸のリンカー；固有XhoI制限部位；CC49V $_H$ 領域；NheI制限部位；penPターミナーター；およびBamHI制限部位を含有している(図8参照)。このpenPプロモーターとpenPターミナーターは、Mezesら、J. Biol. Chem., 258巻、

11211~11218頁、1983年に記載されている。

上記のリゲーション反応物の一部(3  $\mu$ L)を、LB-AMP100寒天プレート上にプレートし次いで一夜増殖させたコンピテント大腸菌AG1細胞を形質転換するのに用いた。penPターミナーター、インサートを含有するポテンシャルクローンを、Pharmacia社(米国、メリーランド州、ガイサズバーク所在)のT7 Quickprime <sup>TM</sup> P DNA 標識キットと、Bulwelsら、Nucleic Acid Research, 17巻、452頁、1989年に記載されているマイクロ波によるコロニー溶解法とともに用いてスクリーニングした。プローブは、penP-NheI-BamHIターミナーターフラグメント自体であるが、Quickprimeキットによって提供された指示によって製造し使用した。陽性プローブであり、かつBamHIおよびNheIによる消化物由来の207個の塩基対挿入断片(図6に示す1958~2165の塩基対(bp))を含有するクローンをpSL301HTと命名し、次いでCC49VHに対するヌクレオチド配列を含有するpSL301HTを構築するのに選択した。NheI-BamHI penPターミナーターをpSL301中に配置した理由は、そのNheIとBamHIの部位の間のポリリンカー領域中に存在するEco47III制限エンドヌクレアーゼ部位を除くためであった。このことは、Eco47III部位が、構造体中に各連続V領域を配置するためにユニークである必要がある $V_L$ と $V_H$ の領域を結いて構築するため設計された。各V領域がEco47III-NheI部位に付加されると、Eco47IIIは各場合に破壊されて、ユニーク挿入断片に入ってくる次のEco47III部位を形成した。

V $_L$ 配列は、PCR増幅の標的としてpSCFV UHMを用い、オリゴの5' SCP1と3' オリゴSCP5によってPCRで作製した。SCP1に対するDNA配列(SEQ ID NO: 10)とSCP5に対するDNA配列(SEQ ID NO: 11)は次のとおりである。

SCP1: 5' -TAAA CTC GAG GTT CAG TTG CAG CAG-3'

SCP5: 5' -TAAA GCT ACC ACC GCT TAG TGA CGA GAC GGT GAC TGA GGT-3'

下線をつけた部分はエンドヌクレアーゼ制限部位を示す。

増幅されたV $_L$ DNAを、4%のPAG、電気泳動、エタノールによる沈降および20  $\mu$ L水への溶解によって精製した。そのV $_L$ 配列をXhoIとNheIの制限酵素で消化し、同じ制限酵素で消化され続いて精製されたpSL301ベクターに対するインサートとして用いた。標準のリゲーション反応を行い、次いで一部分(4  $\mu$ L)を用いてコンピテント大腸菌AG1細胞を形質転換させた。形質転換された細胞を、LB-AMP100寒天プレート上にプレートした。CC49V $_L$ インサートを含有していることを示す候補的クローンをNheIおよびXhoI消化スクリーンから取出した。

United States Biochemical (USB)社(米国、オハイオ州クリーブランド所在)のSequence Kit、および配列決定用プライマーpSL301SEQB(pSL301ベクター中、XhoI部位から57bp上流においてアニールした21bpの配列決定プライマー)とCC49VHPを用いて、DNAの配列決定を行って、CC49V $_L$ の配列を確認し、pSL301HT中に正しいCC49V $_L$ 配列を有するクローンを明らかにした。このプラスミドはpSL301-HHL7およびpSL301-HLHTの両者を構築するときの出発点で使った。使用した配列決定用のオリゴをここに示す。

pSL301SEQB(SEQ ID NO: 12)およびCC49V $_L$ (SEQ ID NO: 13)のオリゴヌクレオチド配列は次のとおりである。

pSL301SEQB: 5' -YCG TCC GAT TAG GCA AGC TTA-3'

CC49VHP: 5' -GAT GAT TTT AAA TAC AAT GAG-3'

#### 実施例1 p49LHHLの構築

pSL301HT(5  $\mu$ g)を出発物質として用い、これをEco47IIIおよびNheIで消化し、大きい方のベクターフラグメントを精製した。CC49V $_H$ 挿入フラグメントは、5' オリゴとしてSCPGCを用いつつ

3' オリゴとしてSCP5を用い、PCRによって製造した。SCP6Bのヌクレオチド配列(SEQ ID NO: 14)は下記のとおりである。

SCP6B: 5' -TAAA TGC GCA GAT GAC GCA AAG AAA GAC GCA GCT AAA AAA GAC GAT  
GCC AAA AAG GAT GAC GCC AAG AAA GAT CTT GAG GTT CAG TTG CAG CAG  
TCT-G'

またオリゴ SCP6Bはリンカーのコーディング領域の一部(SEQ ID NO: 14のbp 8~76)を含有している。pSCFV UHM中のCC49VH標的のアニールするよう設計された該オリゴの部分は、SEQ ID NO: 14中のbp 77~80由来のものである。

下線をつけた配列はPspI部位に相当する。得られたPCRインサートを精製し、PspIとNheIで消化し次いでpSL301HT Eco47III-NheIベクターとのリゲーション反応に用いた(図7)。コンピテント大腸菌AG1細胞を、このリゲーション反応物(3  $\mu$ L)で形質転換を行うのに用い、LB-AMP100寒天プレート上にプレートした。pSL301HT生成物を示す正しい大きさのXhoI-NheIインサートを有する2個のクローンの配列をオリゴSCP1を用いて決定し、正しい配列(図7のヌクレオチド1124~1543)を有する単クローンをその後の構築に用いるのに選んだ。SCP1のヌクレオチド配列(SEQ ID NO: 16)は下記のとおりである。

SCP1: 5' -TG ACT TTA TGT AAG ATG ATG T-3'

最終のリンカーV $_L$ サブユニット(bp1544~1983、図7)は、5' オリゴのSCP7bと3' オリゴのSCP8aを用いつつPCRの標的としてpSCFV UHMを用いて製造した。SCP7bのヌクレオチド配列(SEQ ID NO: 17)は下記のとおりである。

SCP7b: 5' -TAAA TGC GCA GAT GAC GCA AAG AAA GAC GCA GCT AAA AAA GAC GAT  
GCC AAA AAG GAT GAC GCC AAG AAA GAT CTT GAG ATT GTC ATG TCA CAG TCT  
CC



下線をつけたヌクレオチドは FspI 部位である。SCP8a のヌクレオチド配列 (SEQ ID NO: 18) は下記のとおりである。

SCP8a: 5' -TAA GCT AGC TTT TTA CTT AAG CAC  
CAG CTT CGT CCC-3'

下線をつけた最初の組は NheI 部位に相当し、もう一つの組は AflII 部位に相当する。SCP70 のヌクレオチド 8~76 はリンカーをコードし (図 7 のヌクレオチド 1544~1612)、一方 V<sub>H</sub> にアニールするヌクレオチド 77~99 は図 7 の 1613~1635 に相当する。プライマー SCP8a は、その 5' 末端の短いテール、NheI 制限部位、終止コドン、AflII 制限部位および V<sub>H</sub> の最後の 21 個の塩基を含有している。FspI と NheI による消化の後、この得られた 420bp のインサートを精製して複製 pSL30HHT ベクターの NheI と Eco47III の部位に連結し、候補的なクローンを NheI と XhoI でスクリーニングし、正しい大きさのインサートが確認されかつ 49LFR2 (-) と SQP1 で配列が決定されて、pSL30HHT 中に新たに挿入された配列が確認された。そのヌクレオチド配列 (SEQ ID NO: 18) は下記のとおりである。

49LFR2 (-): 5' -CTG CTG GTA CCA GGC CAA G-3'

プラスミド pSL30HHT を XhoI および NheI で消化し、精製し、得られた 1178bp V<sub>H</sub>-リンカー-V<sub>H</sub>-リンカー-V<sub>H</sub> セグメントを pSCPV UHM に連結して p49LHLH を製造した。なおこの pSCPV UHM は同じ制限酵素で切断されその大きい方のフラグメントを精製したものである。そのリゲーション反応生成物 (4 μl 部分) を用いてコンピテント大腸菌 AG1 細胞 (Stratagene 社) を形質転換し、LBCAM20 寒天プレートにプレートした。正しい制限酵素地図を有するプラスミドを含有する単クローンを、p49LHLH を含有させるために選択した。p49LHLH は、CC49 多価一本鎖抗体 scPv2: V<sub>L</sub>-L-V<sub>H</sub>-L-V<sub>H</sub>-L-V<sub>H</sub> または CC49scPv2 (LHLH) の penP プロモーターとヌクレオチ

ド配列を含有している。

#### 実施例 2: p49LHLH の構築

p49LHLH の構築を図 11 に図式的に示す。リンカー V<sub>H</sub> のサブユニットを 5' オリゴの SCP7b と 3' オリゴの SCP9 で製造した。

SCP9: 5' -TAA AGC TAG CAC CAA GGC CTT AGT TTC  
AGC ACC AGC TTG CTC CCA G-3'

SCP7b オリゴ (ヌクレオチド 8~76) は図 6 のリンカーをコードし (ヌクレオチド 1124~1192 に相当する) および図 6 の V<sub>H</sub> のヌクレオチド 1193~1215 に相当する。PCR に対する pSCPV UHM 鎖 (ヌクレオチド 77~99) にアニールした。

SCP9 は、NheI 部位 (第一の下線をつけたヌクレオチド) と Eco47III 部位 (第二の下線をつけたヌクレオチド) を有し、これらの部位は次の V 領域を受けるための pSL30HHT を作るのに必要な制限部位である。SCP9 のヌクレオチド 18~23 は図 6 のヌクレオチド 1532~1537 (リンカーの最初の 2 個のアミノ酸をコードしている) に相当し、一方ヌクレオチド 24~46 は、PCR における SCP9 のアニール領域である図 6 に示すヌクレオチド 1508~1531 に相当する。プラスミド pSL30HHT を Eco47III と NheI で消化し、そしてその大きい方のベクターフラグメントは精製して、予め FspI と NheI で処理され精製された、PCR からのリンカー-CC49V<sub>H</sub> DNA インサートと連結させる。その連結混合物 (3 μl) を用いて大腸菌 AG1 コンピテント細胞を形質転換し、次いで正しい XhoI-NheI の大きさのフラグメントを有する一つのコロニーの配列をオリゴ PENPTSEQ2 を用いて決定した。そのヌクレオチド配列 (SEQ ID NO: 21) は下記のとおりである。

5' -TTG ATC ACC AAG TGA CTT TAT G-3'

配列決定の結果は、得られた pSL30HHT クローン中に PCR の誤まり

と欠失があることを示した。図 6 にみられるヌクレオチド 1533~1537 に相当する 5 個の塩基の欠失がみとめられ、そして T であるべきはずのヌクレオチド 1531 は DNA 配列のデータから確認したところ実際には G であった。得られた配列は、

5' ...GAAGCGCTT... であった。

こゝで下線をつけた配列は偶然に Eco47III 部位を形成した。図 6 の AGCGCT の配列はヌクレオチド 1530, 1531, 1532, 1538, 1539 および 1540 に相当する。この誤まりは次のステップで修正され、オリゴ SCP6C の末端に 5 塩基の欠失を組込むことによって pSL30HHT を製造した。

SCP6C: 5' -TAAGCGCTGATGATGCTAAGAAGGACGCCGCAAAAAA  
GGACGACGCAAAAAAAGATGATGCAAAAAAAGGATCTGG  
AGGTTTCAGTTGCAGCAGTCTGAC-3'

SCP6C 中の下線をつけた配列は Eco47III 部位に相当する。PCR において、SCP6C は 5' オリゴとして用いられ一方 SCP10 は 3' オリゴとして用いられ、リンカー CC49V<sub>H</sub> セグメントが生成する。

SCP10 のヌクレオチド配列 (SEQ ID NO: 23) は下記のとおりである。

SCP10: 5' -TTG TGC TAG CTT TTT ATG AGG AGA CGG TGA  
CTG AGG TT-3'

SCP10 中の下線をつけた配列は図 8 のヌクレオチド 1958~1963 に見られる NheI 部位に相当する。この場合、PCR インサートは NheI だけで消化され次いで精製される。ベクター (pSL30HHT) は Eco47III 部位 (先に形成されている) および NheI 部位で消化され次いで精製された。そのインサートとベクターは連結され、その一部分 (3 μl) を使ってコンピテント *E. coli* AG1 細胞を形質転換した。この形質転換細胞を LB-AMP100 プレート上にプレートし次いで候補的なクローンを XhoI と NheI でスクリーニングした。正しい大きさ

の DNA を有する 3 個のクローンを得た。これらのクローンのうちの 2 個は、オリゴ 49VLCDR3 (+) および SQP1 を用いて配列を決定した。そのヌクレオチド配列 (49VLCDR3 (+)) の DNA ID NO: 24) は下記のとおりである。

49VLCDR3 (+): 5' -CAG CAG TAT TAT AGC TAT-3'

正しい配列を有する一つのクローンが得られ、そして図 6 のヌクレオチド 1533~1963 からの配列が確認され、正しい pSL30HHT クローンを示した。

大腸菌中で発現させるのに用いる最終的なプラスミド p49LHLH を製造するために、pSL30HHT (5 μg) を NheI と XhoI で消化し、次いで V<sub>L</sub>-L-V<sub>L</sub>-L-V<sub>H</sub> 配列を含有する小さい方のインサートを精製した。この断片を、pSCPV UHM (5 μg) を XhoI と NheI で消化して得た大きい方のベクターフラグメントの精製物と連結した。上記連結混合物の一部 (4 μl) を使ってコンピテント大腸菌 AG1 細胞を形質転換した。得られた形質転換混合物を LB-CAM20 プレート上にプレートし、次いで p49LHLH に対する代表的なクローンを、正しい制限酵素地図 (図 10 参照) および TAG-72 に対する生物活性に基づいて選択した。

#### 実施例 3 CC49 scPv2 の LHLH と LHLH が共有結合した二量体の精製

CC49 の共有結合した一本鎖二量体 (scPv2) の精製を行うために、大腸菌のペリプラズマ細胞質の部分を、p49LHLH と p49LHLH の両者の 1.0 L の一夜培養物から調製した。要約すると、培養物を 250 mL づつの 4 部分に分注し、Sorvall GS-3 ロータで 10 分間 5000 rpm で遠心分離した。ペレット化した細胞を洗浄し、30 mM NaCl を含有する 10 mM トリス-HCl pH 7.3 からなる 100 mL 中に再懸濁させた。細胞を再びペレット化し、合計 100 mL の 30 mM トリス-HCl pH 9 で洗浄し、そして一つのチューブにブールした。このチューブに、40 w/v %

のスクロースを含有する30mMトリス-HCl pH 7.3(100mL) および10 mM EDTA pH 7.5(2.0mL) を添加した。得られた混合物を、時々振盪しながら、室温に10分間保持した。高張性細胞 (hypertonic cell) を前記のようにしてペレット化した。次のステップでショックを与えて、該ペレットを20mLの氷冷 0.5M MgCl<sub>2</sub>中に速やかに懸濁させ、次いで時々振盪しながら氷上に10分間保持した。その細胞を前記のようにしてペレット化し、大腸菌の周辺細胞質の画分を含有する上澄み液を、0.2μmの Nalge社 (米国、ニューヨーク州、ロチェスター所在) の濾過装置で濾過することによってさらに清澄にし、次いでAmicon社 (米国、マサチューセッツ州、ダンバース所在) の Centriprp 30およびCentricon 30で 1.0mLより小さい容積まで濃縮した。

p49LHLHまたは p49LHHLのクローン由来の濃縮周辺細胞質のショック (shockate) を、Pharmacia社 (米国、ニュージャージー州、ビスカウエイ所在) の Superdex 75 HR 10/30 HPLC カラム (予め PBSで平衡化させたもの) に注入した。競合 ELISA法で測定する場合、問題の生成物は 0.5mL/分の流量で21~24分間放出させた。活性画分をブールし、先に述べたようにして濃縮し、次に、システム500 Microdialyzer Unit(Pierce Chemical社)を用い、緩衝液を3~4回交換しながら8000MWカットオフ膜を使用して、20mMトリス-HCl pH 7.6に対して一夜透析を行った。その試料を Pharmacia社の Mono Q HR 5/5 アニオン交換HPLCカラムに注射した。緩衝液Aとして20mMトリス-HCl pH 7.6を用い、緩衝液Bとして20mMトリス-HCl pH 7.6+0.5M NaClを用いる勾配プログラムを、1.5mL/minの流量で使用した。問題の生成物は、競合 ELISA法で測定する場合、各々3~4分間カラムから放出させた。この時点の画分の、二つの SDS-PAGEゲルによる分析で、一方のゲルはクーマシーブリアン

ブリンB、ウシカルボニックアンヒドラーゼ、ヒトカルボニックアンヒドラーゼ、ウマミオグロブリン、ヒトヘモグロビンAとC、3種のヒマメレクチンおよびシトクロムCが含有され、pI値はそれぞれ4.65, 5.10, 6.00, 6.50, 7.00, 7.50, 7.8, 8.00, 8.20 および 8.6であった。ゲルは FMCの指示にしたがって染色し脱色した。DNASTAR プログラムによって両方の scFv2の種のpI値として 8.1の値が予測された。純品の生成物に対し単一の均一なバンドがゲル上に、両者のpI値の 6.9の位置にみとめられた。

IgG, scFv2 (LHLHおよびLHHL) のような精製CC49抗体は、280nm波長光の吸光度を分光光学的に測定することによって定量した。モル吸光係数値  $\epsilon_m$  は各々、先に引用した Wetlawferの式を用いて測定した。

そのアミノ酸組成に基づいて、CC49IgG, CC49scFv2LHLH, CC49scFv2LHHLおよびCC49scFvの  $E_{280}^{1\%}$  (280nm)値はそれぞれ 1.49, 1.65, 1.65および1.71であった。

#### 実施例 4

CC49scFv2の種のLHLHとLHHLの相対活性を、IgGおよびCOOH末端にFLAGペプチドを有する単量体scFv型と比較した。

パーセント競合(percent competition)を下記式によって ELISAのデータから求めた。

$$\frac{\text{ゼロ競合-試料競取り値 (OD 405-450nm)}}{\text{ゼロ競合-100\%競合}} \times 100$$

“ゼロ競合(zero competition)”値は、1% BSAをビオチニル化 CC49 (3×10<sup>14</sup>モル) と1:1比率で混合して測定し、一方 100%競合値はビオチニル化 CC49IgGと混合した CC49IgGの 5 μg/mL試料に基づいた値である。これらのデータは図11に示す。試料の吸光度値は 405nm~450nmで測定した。3回の競取り値の平均値を使

トブルーR250で染色し、他方のゲルはウェスタン分析 (ブローブ抗体としてビオチニル化 FAID 14を使用) に移されたが、scFv2(LHLHまたはLHHL)の種の計算分子量の単一バンドが、58,239ダルトンの位置に出現した。活性画分は各場合濃縮し、50mM MES pH 5.8に対して一夜透析し、次いで Pharmacia社の Mono S HR 5/5 カチオン交換カラムに注射した。この精製ステップからの問題の二つの画分の5と6は、SDS-PAGE法および ELISA法で測定する場合、勾配液の使用が開始される直前に溶出された。したがってこれらの画分は実際にはカラムに結合していなかったわけである。次いで画分5と6はさらに精製するためにブールした。

Mono Qカラムを活性Mono S画分について再度使用したが使用した緩衝液は20mMトリス-HCl pH 8.0であり、流量は 0.8mL/分に低下させた。生成物はカラムとの結合なしで放出されたが、Mono Sに残っている不純物がわずかにあり、したがって分離は5~6分間かかった。この処理を行った後、生成物は均質であり以後の特性決定のために貯蔵した。

#### 等電点電気泳動

精製物の等電点(pI)は DNASTAR社 (米国、ウィスコンシン州、マディソン所在) のコンピュータプログラム Protein-titrateを使用し予測した。アミノ酸組成、MWおよびpI値に基づいて計算した。

試験では、pIは、FMC Bioproducts社 (米国、メーン州、ロックランド所在) の Isogel IEPプレートpH範囲3~10を使用して測定した。上記 IEPを操作するために、Biorad社 (米国、カリフォルニア州、リッチモンド所在) の電気泳動装置を、上記両メーカーの指示にしたがって使用した。その電気泳動の条件は、20mAで 500V (限定) および一定電力の10Wであった。等電点電気泳動は90分間で完了した。Biorad社の IEP標準品は、フィコシアニン、βラクトグロ

用した。最初に試料 (25 μL) を、TAG-72でコートしたマイクロリットルプレートに、1.0×10.10 モルの結合部位/mLで塗布した。ビオチニル化CC49 (4 μg/μL 1:20,000に希釈、25 μL使用) で試料を1/2濃度に希釈した。連続希釈法 (1:2) を行った。両方の形態の scFv2は IgGには等しい (図11参照)。別の試験で、CC49scFv単量体を Fabフラグメントと比較した。両者は一価であるが、これらは TAG-72に対する結合アフィニティーが等しいことを示した。これらの結果は、共有結合の二量体の両者の形態は、二つの充分に機能的な抗原結合部位をもっていることを示している。これは、単量体の種に比べて全 IgGについてみられるのと同じ結合力の増大である。

またこれらのデータは、scFv2分子が、その CC49IgGの種と同様に、免疫治療用途の候補であり、毛細血管透過性の増大および一層迅速な生体分布動態の利点を有することを示している。この利点によって、既存の IgG分子に比べて、本発明の化合物は多数回注射することができ、かつ癌治療に用いる免疫療法において腫瘍組織比を高くすることができる。

本発明の他の実施態様は、本明細書を検討するかまたは本願に開示されている発明を実施することから、当該技術分野の当業者にとって明らかになるであろう。本明細書と実施例は例示だけを目的とするもので、本発明の真の適用範囲と思想は以下の特許請求の範囲によって示される。

以上

FIGURE 1

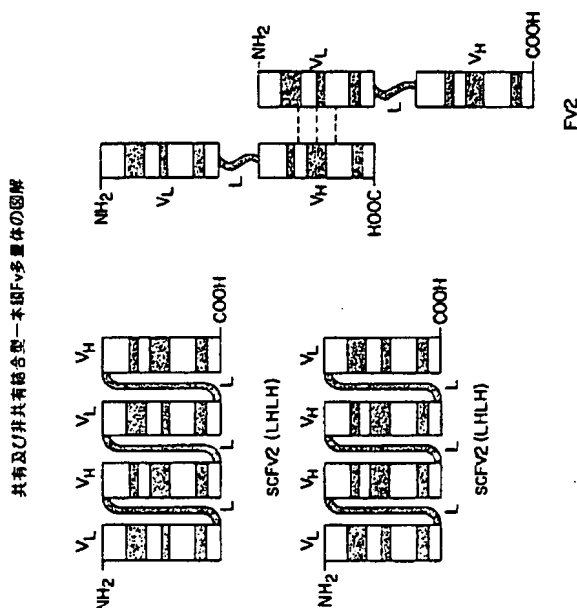


FIG. 2

[illegible]

FIG. 3

Asp Ile Val Met Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Pro Val Ser Val  
 Gly Glu Lys Val Thr Leu Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Lys  
 Tyr Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys  
 Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Ala Arg  
 Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr  
 Asp Phe Thr Leu Ser Ile Ser Ser Val Lys Thr Glu Asp Leu Ala  
 Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly  
 Ala Gly Thr Thr Leu Val Leu Lys

FIG. 4

GAG GTT CAG TTG CAG CAG TCT GAC GCT GAG TTG GTG AAA CCT  
GGG GCT TCA GTG CAG ATT TCC TGC AAG GCT TCT GGC TAC ACC  
TTC ACT GAG CAT GCA ATT CAC TGG GAG AAA CAG AAC CCT GAA  
CAG GGC CTG GAA TGG ATT GGA TAT TTT TCT CCC GGA AAT GAT  
GAG TTT AAA TAC AAT CAG AGG TTC AAG GGC AAG GCC ACA CTT  
ACT GCA GCA AAA TCC TGG AGC ACT GCC TAC GCG CAG CTC AAC  
AGC CTG ACA TCT GAG GAT TCT GCA GTG TAT TTC TGT ACA AGA  
TCC CTG AAT ATG GCC TAC TGG GGT CAA GGA ACC TCA GTC ACC  
GTC TCC TAA

FIG. 5

Glu	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Ser	Asp	Ala	Glu	Leu	Val	Lys	Pro	Gly
Ala	Ser	Val	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr
Asp	His	Ala	Ile	His	Trp	Val	Lys	Gln	Asn	Pro	Glu	Gln	Ole	Leu
Glu	Trp	Ile	Gly	Tyr	Phe	Ser	Pro	Gly	Asn	Asp	Asp	Phe	Lys	Tyr
Asn	Glu	Arg	Phe	Lys	Gly	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Ala	Asp	Lys	Ser
Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr	Val	Gln	Leu	Asn	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp
Ser	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys	Thr	Arg	Ser	Leu	Asn	Met	Ala	Tyr	Trp
Gly	Gln	Gly	Thr	Ser	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ser				

**FIGURE 6**

抄書(内容に変更なし)

CC49 VL-L-VH-L-VL-L-VH-DNA及UP三ノ酸配列

46	Feb 1	Cla I	TCT	TTC	ACA	GCT	TAT	CAT	GGA	TGA	ATT	GCA	TCA	CTT	CCC	TCC
94			GTT	GTT	CTC	CGG	GTG	GAA	ACG	AGC	TCA	TCT	CGT	TCC	GAA	AAA
142			ACG	GTT	GCA	TTT	AAA	TCT	TAC	ATA	TAT	AAT	ACT	ATC	AAA	GAC
190			TCT	AAC	ATT	TCA	TCT	TTC	ACT	CGG	CTG	AAA	GAT	CGT	ACG	TAC
238			TTG	TTT	CGT	GAT	TGT	TCA	AGC	CAT	GTA	CGG	ATA	GTG	GAA	
286			GTG	CTT	CAT	CTG	GTT	ACG	ATC	AAT	CAT	ATA	ATA	CGG	AGG	ACG
334			ATT	TTG	ATC	AAA	TAC	CTA	TTG	CGT	ACG	GCA	GCG	GCT	GGA	TTG
382			Leu	Ala	Ala	Gln	Pro	Ala	Met	Ala	Val	Met	Ser	Gln	Ser	Pro
430			CTC	GCT	GGC	CAC	CCA	CGC	ATG	GGC	GAC	ATT	GTG	ATG	TCA	CAG
478			Ser	Ser	Leu	Pro	Val	Ser	Val	Gly	Gln	Lys	Val	Leu	Ser	Cys
			TCT	TCC	CTA	CGT	CTA	GTT	GGC	GAG	AGG	GTT	ACT	TTG	ACG	TGC
			Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Leu	Tyr	ACT	Ian	Gln	Lys	Asn	Tyr	Leu
			TCC	ACT	ACG	ACC	GCT	TTA	TAT	ACT	GCT	AAA	CAG	AAG	TAC	GCC

FIG. 6D

240  
 Phe Cys Thr Arg Ser Leu Asn Met Ala Tyr Trp Gly Gln Thr Ser  
 TTC TGT ACA ACA TCC CTG AAT ATG GGC TAC TGG GGT CAA GGA ACC TCA  
 250  
 Val Thr Val Ser Ser Leu Ser Ala Asp Asp Ala Lys Lys Lys Asp Ala Ala  
 GTC ACC GTC TCC TCA CTA AGC GCA GAT GAC GCA AAG AAA GAC GCA CCT  
 260  
 Lys Lys Asp Asp Ala Lys Lys Asp Ala Lys Lys Lys Asp Leu Asp Ile  
 AAA AAA GAC GAT GGC AAA AAG GAT GAC GCC AAG AAA GAT GTT GAC ATT  
 270  
 Val Met Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Pro Val Ser Val Gly Gln Lys  
 GTG ATG TCA CAG TCT CCA TCC CTA CTT GTG TCA GTT GGC GAG AAG  
 280  
 Val Thr Leu Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser Gly Asn  
 GTT ACT TTG AGC TGC AAG TCC AGT CAG ACC GTT TTA TAT AGT GGT AAT  
 290  
 Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro  
 CAA AAG AAC TAC TTG GCC TGG TAC CAG CAG AAA CCA GGG CAG TCT CCT  
 300  
 310  
 320

FIG. 6B

50  
 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp  
 TGG TAC CAG CAG AAA CCA GCG CAG TCT CCT AAA CTG CTG ATT TAC TGG  
 60  
 Ala Ser Ala Arg Gln Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly  
 GCA TCC GCT AGG GAA TCT GCG GTC CCT GAT GCG TTC ACA GGC AGT GGA  
 70  
 Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Ser Ser Val Lys Thr Gln Asp  
 TCT GCG ACA GAT TTC ACT CTC TCC ATC AGC AGT GTG AAG ACT GAA GAC  
 80  
 Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe  
 CTG GCA GTT TAT TAC TGT CAG CAG TAT TAT AGC TAT CCC CTC AGC TTC  
 90  
 Gly Ala Gly Thr Lys Leu Val Leu Lys Leu Ser Ala Asp Asp Ala Lys  
 GGT GCT GGG ACC AAG CTG CTG AAG CTT AGT GCG GAC GAT GCG AAA  
 100  
 110  
 120  
 130  
 Lys Asp Ala Ala Lys Lys Asp Asp Ala Lys Lys Asp Asp Ala Lys Lys  
 AAG GAT GCT GCG AAG AAG CAG GAT GAC GCT AAG AAA GAC GAT GCT AAA AAG  
 140

FIG. 6E

330  
 Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Ala Arg Gln Ser Gly Val Pro Asp  
 AAA CTG CTG ATT TAC TGG GCA TCC GCT AGC GAA TCT GCG GTC CCT GAT  
 340  
 Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Ser  
 CCG TTC ACA GGC ACT GGA TCT GCG ACA GAT TTC ACT CTC TCC ATC ACC  
 350  
 Ser Val Lys Thr Gln Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr  
 AGT GTG AAG ACT GAA GAC CTC GCA GTT TAT TAC TGT CAG CAG TAT TAT  
 360  
 AGC TAT 380  
 Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Val Leu Lys Leu  
 AGC TAT CCC CTC AGC TTC GGT GCT GCG ACC AAG CTG CTG CTG AAG CTA  
 390  
 Eco47 III  
 Ser Ala Asp Asp Ala Lys Lys Asp Ala Lys Lys Asp Asp Ala Lys  
 AGC GCT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT  
 400  
 Lys Asp Asp Ala Lys Lys Asp Leu Gln Val Gln Gln Gln Ser Asp  
 AAG GAT GAT GCA AAA AAG GAT CTG GAG GTT CAG TTG CAG CAG TCT GAC  
 410  
 Ala Gln Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala  
 CCT GAG TTG GTG AAA CCT GCG GCT TCA GTG AAG ATT TCC TCC AAG CCT  
 420  
 430  
 440  
 450  
 460  
 470  
 480  
 490  
 500

FIG. 6C

150  
 Asp Leu Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Asp Ala Gln Leu Val Lys Pro  
 GAC CTC GAG GTT CAG TTG CAG CAG TCT GAC GCT GAT TTG GTG AAA CCT  
 160  
 Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr  
 GCG GCT TCA GTG AAG ATT TCC TGC AAG GCT TCT GCG TAC ACC TTC ACT  
 170  
 Asp His Ala Ile His Trp Val Lys Gln Asn Pro Gln Gln Gly Leu Gln  
 GAC CAT GCA ATT CAC TGG GTG AAA CAG AAC CCT GAA CAG GCG CTG GAA  
 180  
 Trp Ile Gly Tyr Phe Ser Pro Gly Asn Asp Asp Phe Lys Tyr Asn Gln  
 TGG ATT GGA TAT TTT TCT CCC GGA AAT GAT GAT TTT AAA TAC AAT CAG  
 190  
 Arg Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr  
 AGC TTC AAG GCG AAG GCC ACA CTG ACT GCA GAC AAA TCC TCC AGC ACT  
 200  
 Trp Ile Gly Tyr Phe Ser Pro Gly Asn Asp Asp Phe Lys Tyr Asn Gln  
 TGG ATT GGA TAT TTT TCT CCC GGA AAT GAT GAT TTT AAA TAC AAT CAG  
 210  
 Arg Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr  
 AGC TTC AAG GCG AAG GCC ACA CTG ACT GCA GAC AAA TCC TCC AGC ACT  
 220  
 Ala Tyr Val Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Gln Asp Ser Ala Val Tyr  
 GCG TAC GTG CAG CTC AAC AGC CTC ACA TCT GAG GAT TCT GCA GTG TAT  
 230  
 240  
 250  
 260  
 270  
 280  
 290  
 300  
 310  
 320  
 330  
 340  
 350  
 360  
 370  
 380  
 390  
 400  
 410  
 420  
 430  
 440  
 450  
 460  
 470  
 480  
 490  
 500

FIGURE 7

CC49 VL-L-VH-L-VH-L-VLのDNA及びアミノ酸配列

	Cla I	EcoR I	
5'-C TCA TGT TTG ACA GCT TAT CAT CGA TGA ATT CCA TCA CTY CCC TCC			46
GTT CAT TTG TCC CCG GTG GAA ACG AGC TCA TCA TTT CCT TTC GAA AAA			94
ACG GTT GCA TTT AMA TCT TAG ATA TAT ACT TCT AAA GAC TAC ATT			142
TGT AAG ATT TGA TGT TTG AGT CGG CTG AAA GAT CTT ACG TAC CAA TTA			190
TTG TTY TGT GAT TOT TCA AGC CAT AAC ACT GTA GGG ATA GTG GAA AGA	PENP1-	AAC ACT GTA GGC ATA GTG GAA	238
GTG CTT CAT CTG GTT ACG ATC AAT CAA ATTA TTC AAA CCG ACG GAG ACG			286
	PENP2-	TAT AAG TTT GCC TTC CTC TG	
-22			
Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu			334
ATT TTG ATG AAA TAC CTA TTG CCA ATG CGA GCG GCT GGA TTG TTA TTA			
	Nco I	VL	
Leu Ala Ala Gln Pro Ala Met Ala Asp Ile Val Met Ser Gln Ser Pro			382
CTC GCT GCC CAA CCA GCG ATG GCC GAC ATT TTG ATG TCA CAG TCT CCA			
10			
Ser Ser Leu Pro Val Ser Val Gly Glu Lys Val Thr Leu Ser Cys Lys			430
TCC TCC CTA CTT GTG TCA GTT GCG GAG AAG GTT ACT TTG AGC TGC AAG			
		20	

FIG. 7B

[illegible]

FIG. 6F

Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp His Ala Ile His Trp Val Lys Glu Asn	250	1726
TCI GGC TAC ACC TTC ACT GAC CAT GCA ATT CAC TGC GTG AAA CAG AAC		
Pro Glu Glu Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Phe Ser Pro Gly Asn Asp	260	1778
CCT GAA CAG GGC CTC GAA TGG ATT GGA TAT TTT TCT CCC GGA AAT GAT		
Asp Phe Lys Tyr Asn Glu Arg Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala	280	1822
GAT TTT AAA TAC AAT GAG AGC TTC AAG GGC AAG GGC ACA CTG ACT GCA		
Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Val Glu Leu Asn Ser Leu Thr Ser	300	1870
GAC AAA TCC TCC AGC ACT GCC TAC GTG CAG CTC AAC AGC CTC ACA TCT		
Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Thr Arg Ser Leu Asn Met Ala Tyr	310	1918
GAG CAT TCT GCA CTC TAT TTC TOI ACA AGA TCC CTG AAT ATG CCC TAC		
Irp Gly Glu Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser	330	1966
TGG GGT CAA GGA ACC TCA GTC ACC GTC TCC TCA TAA AAA CCT AGC GAT		

FIG. 6G

GAA TCC GTC AAA ACA TCA YCT TAC ATA AAG TCA CTT GGT GAT CAA GCT	2014
SQP1- TGT AGT AGA ATG TAT TTC AGT	
PENTSEQ2- G TAT TTC AGT GAA CCA CTA GTT	
CAT ATC ATT GTC CGG CAA TCG TGT GGG CTT TTT TTG TTT TCT ATC TTT	2062
AAA GAT CAT GTO AAG AAA AAC CGG AAA ATC GGT CTG CGG GAA AGG ACC	2110
GGC TTT TTG TCG AAA TCA TAG CCG AAT GGG TTC GAT TGT GAC AAA ATT	2158
BamH I	
CGG ATC C-3'	2165

FIG. 7C

150  
 Val Thr Val Ser Ser Leu Ser Ala Asp Asp Ala Gln Leu Val Lys Pro  
 GAC CTC GAG GTT CAG TTG CAG CAG TCT GAC GCT GAG TTG GTC AAA CCT 818  
 160  
 Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr  
 GGG GCT TCA GTG AAG ATT TCC TGC AAG GCT TCT GGC TAC ACC TTC ACT 862  
 170  
 Asp His Ala Ile His Trp Val Lys Gln Asn Pro Gln Gln Gly Leu Gln  
 GAC CAT GCA ATT CAC TGG GTG AIA CAG AAC CCT GAA CAG GGC CTG GAA 910  
 180  
 Trp Ile Oly Tyr Phe Ser Pro Gly Asn Asp Phe Lys Tyr Asn Gln  
 TCG ATT GGA TAT TTT TCT CCC GGA AAT GAT GAT TTT AAA TAC AAT GAG 958  
 190  
 Arg Phe Lys Oly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr  
 AGG TTC AAG GGC AAG GCC ACA CTG ACT GCA GAC AAA TCC TCC AGC ACT 1006  
 200  
 Ala Tyr Val Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Gln Asp Ser Ala Val Tyr  
 GCC TAC GTG CAG CTC AAC AGC CTG ACA TCT GAG GAT TCT GCA GTG TAT 1054  
 210  
 Phe Cys Thr Arg Ser Leu Asn Met Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser  
 TTC TGT ACA AGA TCC CTG AAT ATG GGC TAC TGG GGT CAA GGA ACC TCA 1102  
 220  
 Val Thr Val Ser Ser Leu Ser Ala Asp Asp Ala Lys Lys Asp Ala Ala  
 GTC ACC GTC TCC TCA CTA AGC GCA GAT GAC GCA AAG AAA GAC GCA CCT 1150  
 230  
 Lys Lys Asp Asp Ala Lys Lys Asp Asp Ala Lys Lys Asp Leu Gln Val  
 AAA AAA GAC GAT CCC AAA AAG GAT GAC GCC AAG AAA GAT CTT GAG GTT 1198  
 240  
 Gln Leu Gln Gln Ser Asp Ala Gln Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val  
 CAG TTG CAG CAG TCT GAC GCT GAC TTG GTG AAA CCT GGC GCT TCA GTG 1246  
 250  
 Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp His Ala Ile  
 AAG ATT TCC TCC AAG GCT TCT GGC TAC ACC TTC ACT GAC CAT GCA ATT 1294  
 260  
 His Trp Val Lys Gln Asn Pro Gln Gln Oly Leu Gln Trp Ile Oly Tyr  
 CAC TCG GTG AAA CAG AAC CCT GAA CAG GGC CTG GAA TGG ATT GGA TAT 1342  
 270  
 Phe Ser Pro Oly Asn Asp Phe Lys Tyr Asn Gln Arg Phe Lys Oly  
 TTT TCT CCC GCA AAT GAT GAT TTT AAA TAC AAT CAG AGG TTC AAG GGC 1390  
 280  
 Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Thr Thr Ala Tyr Gln  
 AAG GCC ACA CTG ACT GCA AAA TCC TCC ACC ACT GGC TAC GTG CAG 1438  
 290  
 Leu Asn Ser Leu Thr Ser Gln Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Thr Arg  
 CTC AAC ACC CTC ACA TCT GAG GAT TCT GCA GTG TAT TTC TGT ACA AGA 1486

FIG. 7E

380  
 Ser Leu Asn Met Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser  
 TCC CTG AAT ATG GCC TAC TGG GGT CAA GCA ACC TCA GTC ACC GTC TCC 1534  
 390  
 Ser Leu Ser Ala Asp Asp Ala Lys Lys Asp Ala Lys Lys Asp Asp  
 TCA CTA ACC GCA GAT GAC GCA AAG AAA GAC GCA GCT AAA AAA GAC GAT 1582  
 400  
 Ala Lys Lys Asp Asp Ala Lys Lys Asp Leu Asp Ile Val Met Ser Gln  
 GGC AAA AAG GAT GAC GCC AAG AAA GAT CTT GAC ATT GTG ATG TCA CAG 1630  
 410  
 Ser Pro Ser Ser Leu Pro Val Ser Val Gly Gln Lys Val Thr Leu Ser  
 TCT CCA TCC TCC CTA CTT GTC TCA GTT GGC GAG AAG GTT ACT TTG AGC 1678  
 420  
 Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser Gly Asn Gln Lys Asp Tyr  
 TCG AAG TCC AGT CAG GCT TTA TAT AGT GGT AAT CAA AAG AAC TAC 1726  
 430  
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Oly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile  
 AAC CCG ACC ATG GTC GTC 1774  
 440  
 Tyr Trp Ala Ser Ala Arg Gln Ser Oly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly  
 TAC TCG GCA TCC GCT AGG GAA TCT GGG GTC COT GAT GGC TTC ACA GGC 1822  
 450  
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Ser Ser Val Lys Thr  
 AGT GCA TCT GCG ACA GAT TTC ACT CTC TCC ATC AGC AGT GTG AAG ACT 1870  
 460  
 Gln Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Pro Leu  
 GAA CAC CTG GCA GTT TAT TAC TGT CAG 530 1918  
 470  
 Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Val Lys Lys Lys  
 ACG TTC GGT GCT GCG ACC AAG CTO GTG CTT AAG TAA AAA GCT AGC GAT 1966  
 480  
 GAA TCC GTC AAA ACA TCA TCT TAC ATA AAG TCA CTT GGT GAT CAA GCT 2014  
 490  
 CAT ATC ATT GTC CCG CAA TCG TGT GGG CTT TTT TTG TTT TCT ATC TTT 2062  
 500  
 AAA CAT CAT GTG AAG AAA AAC CCG AAA ATC GGT CTO CCG GAA AGG ACC 2110  
 510  
 CCG TTT TTG TCG AAA TCA TAG CCG AAT CCG TTG GAT TGT GAC AAA ATT 2158  
 520  
 BamH I  
 CCG ATC C-3' 2165

FIG. 7D

250  
 Val Thr Val Ser Ser Leu Ser Ala Asp Asp Ala Lys Lys Asp Ala Ala  
 GTC ACC GTC TCC TCA CTA AGC GCA GAT GAC GCA AAG AAA GAC GCA CCT 1150  
 260  
 Lys Lys Asp Asp Ala Lys Lys Asp Asp Ala Lys Lys Asp Leu Gln Val  
 AAA AAA GAC GAT CCC AAA AAG GAT GAC GCC AAG AAA GAT CTT GAG GTT 1198  
 270  
 Gln Leu Gln Gln Ser Asp Ala Gln Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val  
 CAG TTG CAG CAG TCT GAC GCT GAC TTG GTG AAA CCT GGC GCT TCA GTG 1246  
 280  
 Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp His Ala Ile  
 AAG ATT TCC TCC AAG GCT TCT GGC TAC ACC TTC ACT GAC CAT GCA ATT 1294  
 290  
 His Trp Val Lys Gln Asn Pro Gln Gln Oly Leu Gln Trp Ile Oly Tyr  
 CAC TCG GTG AAA CAG AAC CCT GAA CAG GGC CTG GAA TGG ATT GGA TAT 1342  
 300  
 Phe Ser Pro Oly Asn Asp Phe Lys Tyr Asn Gln Arg Phe Lys Oly  
 TTT TCT CCC GCA AAT GAT GAT TTT AAA TAC AAT CAG AGG TTC AAG GGC 1390  
 310  
 Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Thr Thr Ala Tyr Gln  
 AAG GCC ACA CTG ACT GCA AAA TCC TCC ACC ACT GGC TAC GTG CAG 1438  
 320  
 Leu Asn Ser Leu Thr Ser Gln Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Thr Arg  
 CTC AAC ACC CTC ACA TCT GAG GAT TCT GCA GTG TAT TTC TGT ACA AGA 1486

FIG. 7F

490  
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Ser Ser Val Lys Thr  
 AGT GCA TCT GCG ACA GAT TTC ACT CTC TCC ATC AGC AGT GTG AAG ACT 1870  
 500  
 Gln Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Pro Leu  
 GAA CAC CTG GCA GTT TAT TAC TGT CAG 530 1918  
 510  
 Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Val Lys Lys Lys  
 ACG TTC GGT GCT GCG ACC AAG CTO GTG CTT AAG TAA AAA GCT AGC GAT 1966  
 520  
 GAA TCC GTC AAA ACA TCA TCT TAC ATA AAG TCA CTT GGT GAT CAA GCT 2014  
 530  
 CAT ATC ATT GTC CCG CAA TCG TGT GGG CTT TTT TTG TTT TCT ATC TTT 2062  
 540  
 AAA CAT CAT GTG AAG AAA AAC CCG AAA ATC GGT CTO CCG GAA AGG ACC 2110  
 550  
 CCG TTT TTG TCG AAA TCA TAG CCG AAT CCG TTG GAT TGT GAC AAA ATT 2158  
 560  
 BamH I  
 CCG ATC C-3' 2165



平成6年 9月1日

特許庁長官 高 島 常 良

1. 事件の表示
- PCT/US93/12039

- ## 2 発明の名称
- 多価の一本鎖抗体

- 1 補正をする者
- | 事件との関係 | 特許出願人 |
|--------|-------|
|--------|-------|

4. 代理人  
住所 〒105 東京都港区虎ノ門一丁目8番10号 野光虎ノ門ビル  
青和特許法律事務所 電話 3504-0721

5. 補正命令の日付  
自発補正

6. 修正の対象
- (1) 明細書、請求の範囲及び要約書の翻訳文
  - (2) 図面の翻訳文
  - (3) 委任状

7. 修正の内容
- (1) 明証書、請求の範囲及び要約書の翻訳文の浄書（内容に変更なし）
  - (2) 図面の翻訳文の浄書（内容に変更なし）
  - (3) 別紙の通り



## 國際調查報告

CLASSIFICATION BY SOURCE STATES IPC 5 C12H15/13 C07H15/20 C12N15/62 A61K39/295		Date of Assignment to PCT/US 93/12239
According to International Patent Classification (IPC) or its later amended classification and IPC		
6. FIELD(S) SEARCHED IPC 5 C12H C07H		
Descriptions contained under the heading classification in the other than first division are indicated in the form attached		
Descriptions that have been modified during the preparation must include of the first one, where possible, either under (a)		
C. DOCUMENTS CITED IN ORDER TO BE RELEVANT		
Category:	Choice of document, with indication, where appropriate, of the relevant paragraph	Reference to other No.
X	WO.A, 91 19739 (CELLTECH LIMITED) 26 December 1991 see example 1	1, 5
Y		2-4, 6
Y	CANCER RESEARCH vol. 52, no. 12, 15 June 1992, PHILADELPHIA, PA, USA pages 3402 - 3408 T. MORITA ET AL., "Rapid tumour penetration of a single-chain Fv and comparison with other immunoglobulin forms" see page 3403, column 2, paragraph 4	3, 6
-/-		
Further documents are listed in the classification of item C.		
Patent family members are listed in item D.		
* Special circumstances of the prior art:		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance		
"B" document not particularly relevant to the prior art		
"C" document relating to a specific aspect of the prior art which is not considered to be of particular relevance		
"D" document relating to a specific aspect of the prior art which is not considered to be of particular relevance		
"E" document relating to a specific aspect of the prior art which is not considered to be of particular relevance		
"F" document relating to a specific aspect of the prior art which is not considered to be of particular relevance		
"G" document relating to a specific aspect of the prior art which is not considered to be of particular relevance		
"H" document relating to a specific aspect of the prior art which is not considered to be of particular relevance		
Date of the patent application of the present invention		
Date of filing of the international patent report		
25 March 1994		
Address for correspondence of the ISA		
Biological Research Center, P.O. Box 1111, Franklin, NJ Tel: (+1-201) 991-1111 Fax: (+1-201) 991-1111		
Address of the applicant		
Cupido, H		

調 查 報 告

DOCUMENTS CONTAINED TO BE RELEVANT		Date: 7 December 80 PCT/US 93/12039
Category	Character of invention, state of the art, nature of the invention, etc.	Reference to claim No.
Y	BIOCHEMISTRY vol. 30, no. 42, 22 October 1991, EASTON, PA US pages 10137 - 10125 M.W. PANTOLIANO ET AL. 'Conformational stability, folding and ligand-binding affinity of single-chain Bv immunoglobulin fragments expressed in Escherichia coli' cited in the application see page 10120, column 1, paragraph 2	2,4
X	EP,A,0 506 124 (TAMOX BIOSYSTEMS, INC.) 30 September 1992 see example 4	1,5
P,X	WO,A,93 11161 (EMZON, INC.) 10 June 1993 see figure 19A	1,3-6

國 際 調 查 報 告

Patent documents listed as sources report		Publication date	Patent family (member(s))	Publication date
WO-A-9119739		26-12-91	AU-a- EP-A- GB-A- JP-T-	7883181 0486632 2250993 5502039
				07-01-92 27-03-92 24-04-92 18-04-93
EP-A-0506124		30-09-92	AU-B- AU-A- JP-A-	6405643 1299292 5117164
				02-09-93 15-10-92 16-05-93
WD-A-9311161		10-06-93	AU-A-	3178993
				28-05-93



フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>8</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I
C 0 7 K 16/46		8318 -4H	
C 1 2 N 15/09	Z N A		
//(C 1 2 P 21/08			
C 1 2 R 1:19)			

【公報種別】特許法第17条第1項及び特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第1部門第1区分

【発行日】平成10年(1998)1月13日

【公表番号】特表平7-503622

【公表日】平成7年(1995)4月20日

【年通号数】

【出願番号】特願平6-514437

【国際特許分類第6版】

C12P 21/08

C07K 16/00

16/18

16/32

16/46

C12N 15/09 ZNA

//C12P 21/08

C12R 1:19 )

【F I】

C12P 21/08 9358-4B

C07K 16/00 9356-4H

16/18 9356-4H

16/32 9356-4H

16/46 9356-4H

C12N 15/00 ZNA A 9282-4B

手 続 補 正 書

平成9年7月2日

特許庁長官 虎 井 秀 光 殿

## 1. 事件の表示

平仮6年特許第5114437号

## 2. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

名称 ザウ ケミカル カンパニー

## 3. 代理人

〒105 東京都港区虎ノ門五丁目5番1号 虎ノ門37ビル

青和特許法律事務所 電話 03-5470-1920

氏名 井田士(7751)石止 敬 啓  
大印  
二五五五

## 4. 補正対象事項

明細書及び請求の範囲

## 5. 補正対象項目

明細書及び請求の範囲

## 6. 補正の内容

- (1) 明細書を別紙の通り補正します。  
(2) 請求の範囲を別紙の通り補正します。

## 7. 添付書類の目録

- (1) 明 細 書 1 通  
(2) 請求の範囲 1 通



明 細 書

## 多価の一本鎖抗体

本発明は、本願の多価抗体に関する。

抗体は、異体が外来物であると判断する特定の抗原又は物質に応じて免疫系により誘発されるイムノグロブリンの群に属するタンパク質である。ミグナスの抗体は、各クラスは同一の基本構造を有している。抗体の基本構造は四鎖体、又はその複合体であり、軽鎖と重鎖とよりそれぞれが構成される二つの同一のヘテロダイマーより成る。軽鎖は一本の可変(V)ドメインと一本の定常(C)ドメインとより成り、他方、重鎖は一本の可変性ドメインと、3本以上の定常ドメインとより成る。軽鎖及び重鎖の両者に由来する、それぞれV<sub>L</sub>及びV<sub>H</sub>と称される可変ドメインは、イムノグロブリンの特異性を決定し、他方、定常(C)ドメインは増やなエフェクター機能をもたらす。

アミノ酸配列データは、それぞれの可変ドメインが、4つの比較的保存されたフレームワーク領域(FR)によりフラグメントされている3つの相補性決定領域(CDR)を含んで成ることを示す。このFRは可変領域ドメインの構造保存性を維持するものと考えられている。このCDRは個々の抗体の結合特性によって異なるであり、且つ抗体の結合の特異性の原因であると想定されている。

抗体の基本構造は2本のヘテロダイマーを含むため、抗体は多価分子である。例えば、IgGクラスは二つの同一の抗原結合部位を有しており、他方、五価性IgMクラスは5つの同一の結合部位を有している。

同一の遺伝子系列及び結合特性を有するモノクローナル抗体は腫瘍及び治療薬の開発として重要とされている。モノクローナル抗体は、製造された手順に従い、マウスのリンパ球と適当なマウスミエローマ細胞系との融合により作られたハイブリドーマにより日常的に産出される。しかしながら、ヒトにおけるインビボ治療及び診断にとってのネズミ抗体の投与は、ヒト免疫系により誘発されるヒト抗マウス抗体と並びに副作用を伴っている。

モノクローナル抗体であって、一の鎖に由来する抗体の場合又は可変領域が別の鎖に

果する抗体の定常領域と結合されたものが抗原決定基方法により作られている。例えば、Sahagawa, J. Immunol., 137: 1086-1074 (1986); Sunら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 214-218 (1985); Nishimuraら, Cancer Res., 47: 985-995 (1987); 及び Liebo, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84: 3439-3443 (1987) を参照のこと。これらは腫瘍関連抗原に対するキメラ抗体を開示している。典型的には、キメラ抗体の可変領域はヒト抗体の定常領域に連結されている。かかるキメラ抗体はその組成において大部分がヒトであるため、それらはキメラ抗体よりも免疫原性が実質的に低いものと予測される。

キメラ抗体は、抗原結合にとって必須でないが、その薬理動力学に影響を及ぼすタンパク質結合体のうちの主要部分を構成するFc領域を含有し続けている。免疫療法又は免疫診断における抗体の利用のため、腫瘍組織に迅速に集中し、且つ結合する抗体分子を得ること、及び未結合の抗体が身体から迅速に排除されることが所望される。一般に、小さめの抗体フラグメントは高めの毛管透過性を有しており、そして完全抗体よりも身体からより早く排除される。

抗体と相互作用するのは糖鎖及び電荷の可変領域であるため、一本のV<sub>H</sub>と一本のV<sub>L</sub>とにより一本鎖抗体フラグメント(scFv)が作られており、これは6つのCysを含み、それらはペプチドリンカー(非置換残基 4,216,278号)により連結されたV<sub>H</sub>-L<sub>H</sub>とV<sub>L</sub>-L<sub>L</sub>ペプチドを成しており、ここでLはペプチドリンカーを表している。V<sub>H</sub>とV<sub>L</sub>ドメインが互にV<sub>H</sub>-L<sub>H</sub>とV<sub>L</sub>-L<sub>L</sub>であるscFvが米国特許第5,322,405号に開示されている。

完全抗体にとっての最少限の2つの結合部位と比べてscFvは、一つのそれを持つため、scFvは2以上の結合部位を含む抗体に比べて低い活性を有している。

従って、このポリペプチドの活性を高めるため、且つその抗原認識特性を維持又は高めるため、複数の結合部位を有するscFvの構築を導導することが有利であろう。加えて、標的組織上の別々のエピトープの認識を可能とする、別の免疫エフェクター機能の抗体ベース機構を可能とする、又は治療もしくは診断成分の抗体構築を可能とする二価特異的である多価scFvを構築することが有利であろう。

それぞれ第一ペプチドリンカーにより共有結合している一本のV<sub>H</sub>と一本のV<sub>L</sub>

ドメインとを有する一本鎖抗体フラグメントは、第一ペプチドリンカーによってたけ結合されて、完全抗体の結合能力を維持している多価一本鎖抗体を形成できることが発見された。抗体において、本発明は抗体に対する親和性を有する多価一本鎖抗体であり、ここでこの多価一本鎖抗体は2本以上の可変可変ドメインと2本以上の重鎖可変ドメインとを含んで成り、ここで可変ドメインは少なくとももう一つの別の可変ドメインに連結されている。

別の態様において、本発明は2本以上の一本鎖抗体フラグメントを含んで成る多価一本鎖抗体であり、各フラグメントは抗体に対する親和性を有しており、ここでそれらのフラグメントは第一ペプチドリンカーにより共有結合しており、そして各フラグメントは:

- (a) 重鎖可変ドメインを含んで成る第一ポリペプチド;
- (b) 重鎖可変ドメインを含んで成る第二ポリペプチド; 及び
- (c) この第一と第二のポリペプチドを機能的な結合性成分へと連結せしめる第二ペプチドリンカー;

を含んで成る。別の態様において、本発明は、多価一本鎖抗体をコードするcDNA配列を含有し、ここでこの多価一本鎖抗体に2本以上の一本鎖抗体フラグメントを含んで成り、各フラグメントは抗原に対する親和性を有しており、ここでこれらのフラグメントは第一ペプチドリンカーにより共有結合しており、そして各フラグメントは:

- (a) 重鎖可変ドメインを含んで成る第一ポリペプチド;
- (b) 重鎖可変ドメインを含んで成る第二ポリペプチド; 及び
- (c) この第一と第二のポリペプチドを機能的な結合性成分へと連結せしめる第二ペプチドリンカー;

を含んで成る。この多価一本鎖抗体は、完全抗体の特異性及び活性を有するが、サイズにおいても小さく、より迅速な毛管透過を可能とする抗体フラグメントの構築を可能とする。多価一本鎖抗体は、結合部位が互に異なる抗原決定基でありうる多価一本鎖抗体の構築も可能とするであろう。

#### 図1の簡易図例

図1は、V<sub>H</sub>-L<sub>H</sub>-V<sub>H</sub>-L<sub>H</sub>-V<sub>H</sub> (LHLL) と V<sub>L</sub>-L<sub>L</sub>-V<sub>L</sub>-L<sub>L</sub>-V<sub>L</sub> (LLLL) の形態を有する共有結合型一本鎖抗体及び非共有結合型二一本鎖抗体(Fv2)を示す。

図2は CC49V<sub>1</sub> (SEQ ID NO: 1) のヌクレオチド配列を示す。

図3は CC49V<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 2) のアミノ酸配列を示す。

図4は CC49V<sub>3</sub> (SEQ ID NO: 3) のヌクレオチド配列を示す。

図5は CC49V<sub>4</sub> (SEQ ID NO: 4) のアミノ酸配列を示す。

図6は p49LHLL (SEQ ID NO: 5) におけるCC49一本鎖抗体(LHLL)のヌクレオチド配列及びアミノ酸配列を示す。

図7は p49LHLL (SEQ ID NO: 6) におけるCC49一本鎖抗体(LHLL)のヌクレオチド配列及びアミノ酸配列を示す。

図8はプラスミド pSL3017及びpSL3018の構造を示す。

図9はプラスミド p49LHLLの構造を示す。

図10はプラスミド p49LHLLの構造を示す。

図11はCC49IgG、CC49scFv2及びCC49scFvを用いた、融合因子としてジオチアミル化 (DAB) を用いる融合アッセイの結果を示す。

本明細書で挙げた全ての文獻の教示全体を引用することによって本明細書に記入される。

糖鎖、アミノ酸、ペプチド、保護基、活性基等を略すとき、それらはIUPAC-IUB (Commission on Biochemical Nomenclature) 又は関連分野の文獻に従って略している。

本明細書で用いる「一本鎖抗体フラグメント」(scFv)又は「抗体フラグメント」なる語は、V<sub>H</sub>とV<sub>L</sub>により表わされる、ペプチドリンカー(L)によりV<sub>H</sub>ドメインに連結されたV<sub>L</sub>ドメインを含むポリペプチドを意味する。V<sub>H</sub>とV<sub>L</sub>ドメインとの順序は逆であってよく、V<sub>L</sub>-L-V<sub>H</sub>として表わされるポリペプチドが同様である。「ドメイン」は、独立の領域、例えば抗原結合又は抗原認識を及ぼすタンパク質のセグメントである。

「多価一本鎖抗体」はペプチドリンカーにより共有結合した2以上の一本鎖

抗体フラグメントを意味する。この抗体フラグメントは連結されて、

V<sub>H</sub>-L<sub>H</sub>-V<sub>H</sub>-L<sub>H</sub>-V<sub>H</sub> ; V<sub>L</sub>-L<sub>L</sub>-V<sub>L</sub>-L<sub>L</sub>-V<sub>L</sub> ; V<sub>H</sub>-L<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>-L<sub>L</sub>-V<sub>L</sub> ; 又は

V<sub>L</sub>-L<sub>L</sub>-V<sub>H</sub>-L<sub>H</sub>-V<sub>H</sub>

のV<sub>H</sub>とV<sub>L</sub>ドメインの順序を有する二価の一本鎖抗体を形成してよい。

三価以上の一本鎖の多価抗体は、追加のペプチドリンカーによって二価の一本鎖抗体に連結された1又は数本の抗体フラグメントを有する。好適な型様においては、V<sub>H</sub>とV<sub>L</sub>ドメインの数は等しい。

本発明は、

V<sub>H</sub>-L<sub>H</sub>-V<sub>H</sub>-L<sub>H</sub>-V<sub>H</sub> 又は V<sub>L</sub>-L<sub>L</sub>-V<sub>L</sub>-L<sub>L</sub>-V<sub>L</sub>

で表わされうる多価の一本鎖抗体を提供する。

V<sub>H</sub>-L<sub>H</sub>-V<sub>H</sub>-L<sub>H</sub>-V<sub>H</sub> (LHLL) 及び V<sub>L</sub>-L<sub>L</sub>-V<sub>L</sub>-L<sub>L</sub>-V<sub>L</sub> (LLLL) の形態を有する共有結合型一本鎖抗体を図1に示す。非共有結合型二一本鎖抗体(Fv2)も図1に示している。

本発明において利用するための一本鎖抗体フラグメントは任意の抗体の糖鎖及び/又は重鎖可変ドメインに由来しうる。好ましくは、その重鎖と重鎖可変ドメインは同一の抗体に特異的である。選択されて多価の一本鎖抗体を構築している個々の抗体フラグメントは、同一の抗原に対して特異的でありうるが、又は別々の抗原に対して特異的でありうる。

一本鎖の多価抗体についての DNA配列を含むベクターを作るため、これらの領域をエンコードする遺伝子の配列が必要とされる。適当な DNA配列は公知の起源から入手するか、又は当業界に公知の標準の手続きによって獲得できる。例えば、The U.S. Department of Health and Human Servicesにより公開された KabatらのSequences of Proteins of Immunological Interest 第4版(1991)は、今日まで述べられているほとんどの抗体可変領域の配列を提示している。

遺伝子配列が未知のとき、ベクターの中にクローニングのDNA配列として、逆転写増幅伸介成によりmRNAから獲得したcDNA配列を利用することが一般に可能である。抗体に就いて、mRNAの配列は広範囲にわたるハイブリドーマから獲得できる。例えば、カタログATCC Cell Lines and Hybridomas, American Type Co

ture Collection, 20000 Parklawn Drive, Rockville Md., USA (1990) を参照のこと。その中に挙げられている幅広い様々な抗原と反応性のモノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマがそのCollectionより入手でき、そして本発明において利用される。これらの細胞系及びその他の類似の細胞が、可溶性ドメインをコードするmRNAの基型として、又はモノクローナル抗体自体のアミノ酸配列を決定するために抗体タンパク質を産生するように利用できよう。

抗体の可溶性部分は、適当な宿主動物、通常は家畜動物として最も好都合にはマウスを免疫することにより得られもする。その免疫原は抗原の抗原であるか、又はハプテンであるか。キーホールリンパトヘンシアン(MNH)の如きの抗原に対するこのハプテンの抗原性抗体である。免疫化は宿主哺乳動物への通常は2〜3週間隔きの免疫原の1又は抗原の周回注射によって好適に実施されよう。通常、最後の免疫の3日後、脾臓をとり出し、そしてmRNAが培養系に公知の標準手順により簡単に産生できるようにハイブリドーマを産生するための細胞融合に利用する単細胞懸液と溶解する。

抗原の抗体が産生でき、そしてそのアミノ酸配列だけを知らねばなら、その配列を逆転写することが可能である。

本発明において有用なV<sub>H</sub>及びV<sub>L</sub>ドメインは好ましくは、1990年3月3日に公開された PCT出願 WO 90/04410 及び1989年1月26日に公開された PCT出願 WO 89/00592 に開示されている。陸路哺乳動物タンパク質T2系に対する一連のCC抗体の一つから得られる。より好ましいのは、PCT公開 90/04410 及び WO 89/00592 においてCC49と示されているモノクローナル抗体に由来するV<sub>H</sub>及びV<sub>L</sub>ドメインである。CC49のV<sub>H</sub>をコードするヌクレオチド配列(SEQ ID NO: 1)は図2に示すものと実質的に同じである。CC49のV<sub>L</sub>のアミノ酸配列(SEQ ID NO: 2)は図3に示すものと実質的に同じである。CC49のV<sub>H</sub>をコードするヌクレオチド配列(SEQ ID NO: 3)は図4に示すものと実質的に同じである。CC49のV<sub>L</sub>をコードするアミノ酸配列(SEQ ID NO: 4)は図5に示すものと実質的に同じである。

本発明の抗体フラグメント及び多価の一本鎖抗体を形成するため、適当なペプチドリンカーを得ることが必要である。V<sub>H</sub>とV<sub>L</sub>ドメインを連結するための適

当なリンカーは、V<sub>H</sub>とV<sub>L</sub>ドメインが、一本鎖ポリペプチドであって完全な抗体のものと構造に非常に類似する二次元構造を有し、従ってその抗体フラグメントが由来している完全抗体の結合特性を保持しているポリペプチド鎖へと折りたたまれることを可能にするものである。scFvを産生するための適当なリンカーは、全イムノグロブリンフラグメントのV<sub>H</sub>及びV<sub>L</sub>ドメインが二次元構造であって、その各フラグメントが、そのイムノグロブリンフラグメントが由来している完全抗体の結合特性を保持するような三次元構造を有するように、2以上のscFvを連結することの可能なるものである。希望の特性を有するリンカーは、その開示内容を参照することで本明細書に記入される本図表(例 4.54b, 718号)に開示の方法により獲得できよう。この例 4.54b, 718号に記載の方法により作られたポリペプチド配列より、ポリペプチドをコードする遺伝子配列が獲得できよう。

好ましくは、V<sub>H</sub>とV<sub>L</sub>ドメインを連結してscFvを形成せしめるペプチドリンカーとは実質的に同じアミノ酸配列を有する。

そのリンカーペプチドは抗体フラグメントに対して、その互々の抗体フラグメントへのこのリンカーの結合がその抗原認識部位の結合能力を妨害しないように加減されていることも必要である。

好適なリンカーは、PantolianoらのBiochem. 30, 6317-10125(1991)に開示されているCC50と称されているヘリカルリンカーを基盤とするが、その最初の最後のアミノ酸は、一端にあるTyr1部位と、他端にあるHis100部位により規定されるコドンで変えられている。

好適なリンカーのアミノ酸配列(SEQ ID NO: 5)は下記の通りである:

Leu Ser Ala-Asp-Asp-Ala-Lys Lys Asp Ala Ala Lys Lys-Asp-Asp-Als-Lys Lys-Asp-Asp-Ala-Lys-Lys-Asp-Leu

このリンカーは一般に10〜50のアミノ酸残基である。好ましくは、このリンカーは10〜30のアミノ酸残基である。より好ましくは、このリンカーは12〜30のアミノ酸残基である。最も好ましくは、このリンカーは15〜25のアミノ酸残基である。

本発明の分子の製造のための発現媒体にはプラスミド又はその他のベクターが

含まれる。一般に、かかるベクターは宿主細胞と適合性細胞に由来するレプリコンとコントロール配列を含む。このベクターは通常レプリコン部位、及び形質転換細胞の中で発現型選択を供することでも特定の遺伝子を保持している。例えば、大腸菌 (*E. coli*) (pBR322を用いて容易に形質転換される (Belliver, Gene, 2, 95- (1977)又はSambrookら, Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Press, New York, 第2版 (1989))。

真核細胞にとって適当なプラスミドも利用できよう。S. セレブジヤ (*S. cerevisiae*) 又は一群のパン酵母が真核型生物の中で最も一般的に利用されているが、数多くのその他の例、例えばピシア・パストリス (*Pichia pastoris*) が有用である。多価抗体、例えばATCCより入手できる SP2/0 又はチャイニーズハムスター細胞に由来する細胞の培養物も宿主として利用できよう。哺乳動物細胞にとって適当な典型的なベクタープラスミド pSV2neo及び pSV2gpt (ATCC); pSVI及びpSVI-0 (Pharmacia); pDPPV-1/pMD2d (International Diagnostics, Inc.) である。

本発明のポリペプチドについての遺伝子を発現するための原核及び真核ウイルス発現ベクターの利用も可能である。

この発現ベクター及びこの一本鎖の多価抗体をコードするインサートは、その挿入部位において適合性制限部位を有し、且つその制限部位が挿入の領域によって固有であることが好ましい。ベクター及びインサートの両者とも制限エンドヌクレアーゼにより制限し、次いで任意の様々な方法、例えばSambrookら、前記に記載の方法によりリガーする。

本発明の一本鎖の多価抗体の製造にとって好適なベクターの遺伝子構築物は、構成内に遺伝性転写プロモーター、宿主一本鎖ポリペプチドの合成/翻訳の外への分泌を誘導するシグナルペプチドをエンコードする領域を含むものである。好ましくは、その発現速度は、不溶性物質としてそのポリペプチドが蓄積することを避けるために最適、折りたたみ及び分泌速度とつう合う。レプリコン及びコントロール配列に加えて、一本鎖ポリペプチドの最適な合成にとって適当な要素が必要とされる。これらの要素にはスプライシング信号、並びに転写プロモーター、エンハンサー、及び終止シグナルが含まれる。更に、追加の遺伝子及びその

生成物が薬液及び折りたたみを助長するために必要とされる (シャペロン)。

開示されているベクターはベクターにとって上記の基準を満たすように簡単に改変されよう。かかる改変は入手できる書物及び本明細書における教示により、当業者によって容易に実施される。

更に、このクローニングベクターは選択マーカー、例えば薬剤耐性マーカー、又は宿主細胞による選択できる特徴の発現を引き起こすその他のマーカーを含むことが好ましい。「宿主細胞」とは、懸濁液を用いて培養されたベクターにより細胞内に形質転換されよう細胞である。薬剤耐性又はその他の選択マーカーは形質転換の選別をある程度助長することを意図する。更に、選択マーカー、例えば薬剤耐性マーカーの存在は、発現型生物が培養培養物の中で繁殖することを防ぐうえで利便されよう。この態様において、かかる様々な形質転換細胞の培養物は生存のために必要とされた表現型を必要とする条件のもとで細胞を培養することにより得られるであろう。

本発明の細胞及び細胞は培養系に公知の標準手順を利用して生成されよう。例えば、もしそれが培養培養物の中に分泌されるなら、この一本鎖の多価抗体は固相抽出により濃縮されよう。そのポリペプチドが宿主細胞のペリプラズマ空間へと輸送されるなら、細胞はその細胞に浸透圧ショックを与え、次いで固相抽出、抗原アフィニティークロマトグラフィー又はイオン交換クロマトグラフィーを用いるカラムクロマトグラフィー及びゲル濾過を実行することにより濃縮されよう。不溶性であり、且つ屈折体 (refractile bodies)、選択封入法として存在しているポリペプチドは、細胞の溶解、封入体を溶解するための滅菌と沈降の周回返し、例えばグアニジン-HClによる可溶性化、及び高濃度の新しい溶媒、それに続く生物活性分子の精製によって精製されよう。

一本鎖の多価抗体の活性は当業界に公知の標準アッセイ、例えば結合アッセイ、酵素結合免疫吸収アッセイ (ELISA) 及びラジオイムノアッセイ (RIA) により決定されよう。

本発明の多価の一本鎖抗体は診断及び治療における利用に固有の利点を有する。この多価の一本鎖抗体の利用は、大規模のフラグメント又は抗体分子全体の利用に勝る数多くの利点を有する。それらはその細胞組織により迅速に到達し、そ

して多価からより迅速に排除される。

診断及び/又は治療用途のため、この多価の一本鎖抗体は1又は複数の抗体フラグメントが細胞組織に対して特異的であるように、及び/又は複数の抗体フラグメントが診断もしくは治療因子に対して特異的であるように構築される。

本発明は更に、癌の如きの障害の診断及び/又は治療において有用な時に好都合な薬型構成物も考慮しており、ここでこの癌的抗原はしばしば細胞の表面上で発現される。診断及び/又は治療用途のため、この多価の一本鎖抗体は適当なイメージ又は所産物に当業界に公知の方法によって結合される。本発明の薬型構成物は当業界に公知の方法、例えば電泳の場合、凝集又は凍結乾燥工程によって調製される。

本発明を、その単なる例示を要図する下記の実施例の考案により更に明らかにする。

#### 略 号

BCIP	5-ブロモ-4-クロコ-3-インドールホスフェート
bo	塩基対
Bis-Trisプロパン	(1, 3-ビス(トリス(ヒドロキシメチル)アミノメチルアミノ)プロパン)
BSA	牛血清アルブミン
GBR	組織性成虫胚核
GLISA	酵素結合免疫吸着アッセイ
792	共共有一本鎖Fvダイマー
IBF	等電点電気泳動
Ibp	キロ塩基対
LD	Luria-Bertani 培地
Mab	モノクローナル抗体
NES	2-(N-モルホリノ)ニクタンサルホン酸
MP	分子軌
SDT	ニトロブルーテトラゾリウムクロリド
オリゴ	オリゴヌクレオチド

PAGE	ポリアクリルアミドゲル
PAGE	ポリアクリルアミドゲル電気泳動
PFS	リン酸緩衝食塩水
PCH	ポリメラーゼ連鎖反応
pSCFV	SCFVをコードする DNA配列を含むプラスミド
RTCS	ラジオイムノガイド外科
RT	ラジオイムノ法線
scFv	一本鎖Fvイムノグロブリンフラグメントモノマー
scFvs	共有結合した一本鎖Fvイムノグロブリンフラグメントダイマー
SDS	ドデシル硫酸ナトリウム
TDS	トリス緩衝食塩水
トリス	(トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン)
T7BS	ワイーン20洗滌液
V <sub>h</sub>	イムノグロブリン重鎖可変ドメイン
V <sub>l</sub>	イムノグロブリン軽鎖可変ドメイン

#### 括 弧

CC49: ヒト腫瘍関連タンパク質72(TAG-72)に特異的なIgGモノクローナル抗体; ATCC No. HB9459として寄託。

CC49Fab: 重鎖のN-末端領域に接合している完全軽鎖より成るCC49の抗原結合性領域。

CC49scFv: ペプチドリンカーにより連結されているCC49抗体の二つの可変ドメインより成る一本鎖抗体フラグメント。

CC49v2: ダイマーを構成するように非共有結合している2つのCC49scFv。7vの後ろの数字は、表示の分子のモノマーサブユニットの数を意味する。例えば: CC49v2は六量体の多量体を意味する。

CC49scFv2: 3つのリンカーにより連結されている、2本のCC49v2ドメインと2本のV<sub>h</sub>ドメインとより成る共有結合型一本鎖抗体フラグメント。V<sub>h</sub>(L)とV<sub>h</sub>(H)ドメインとを連結し合わせるのに6つの可能な順序の組合せがある: LBHL, LHLH, LHAM, HLHL, HLHL及びHLLH。

#### プラスミド

pSCFV-UMM: 25のアミノ酸リンカーにより連結されている、CC49の可変重鎖とCC49可変軽鎖とより成るscFvについてのコード配列を含むプラスミド。

pBILH-UV2-pGLH: CC49v2 LHC2又はLH24生成物のそれぞれを生成するためのコード配列を含むプラスミド。

#### 実験例

##### 一) 実験

分子クローニングのための手順は、その開示内容を引用することで本明細書に組み入れられる。Sambrookら、Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Press, New York第2版(1989)及びAusubelら、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, New York(1992)に記載の手順である。

ここで用いた水は全て脱イオン高純度水とした。

##### オリゴヌクレオチドの合成及び調製

オリゴヌクレオチド(オリゴ)は全て、塩物のオ-シアノホスホリボスホウミジット及び合成カラムを用い、Applied Biosystems(Foster City, CA)由来のModel 380A又はModel 381 DNA合成装置のいずれかで合成した。その生成物上の保護基は、濃水酸化アンモニウムの中で55℃で6-15時間加熱することにより除去した。水酸化アンモニウムはエバポレーションを介して除去し、そしてその乾燥混合物を30-40 μlの蒸留水の中に再溶解させた。ポリアクリルアミド-尿素ゲル上の電気泳動の際、オリゴを塩基対(IV)光を用いて可視化させた。DNAバンドをゲルから切り出し、そして1.0Mの100mMのトリス-HCl, pH 7.4, 500mMのNaCl, 5mMのDTAの中で67℃で2時間かけて溶解させた。最終精製は、DNAをSep-Pac(商標)C-18カラム(Willipore, Bedford, MA)に適用し、そして結合したオリゴを80%のメタノールで洗脱させることによって行った。その溶液の体積を約50mlに下げ、そしてDNA濃度を260nm(OD<sub>260</sub>)での光学密度を測定することにより決定した。

##### 制限酵素消化

制限酵素消化は全て、Bethesda Research Laboratories(Gaithersburg, MD),

New England Biolabs, Inc.(Ipswich, MA)又はBoehringer Mannheim(BM, Indanapolis, IN)の参加及び推奨法を用い、その製造者の推奨する手順に従って実施した。固定させた生成物をポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE)により分離させた。そのゲルをニチウムブロミドで染色し、そのDNAバンドを短波紫外により可視化させ、次いでそのDNAバンドを切り出した。そのゲルスライスを、5mMのトリス、2.5mMの酢酸、1mMのEDTA, pH 8.0を含む透析チューブ(Eaton Carlside Corp., Chicago)の中に入れた、そしてMax Submarine電気泳動装置(Boehr Scientific Instruments, CA)を用いて蒸餾させた。サンプル容量をSpeed Vac濃縮器(Savant Instruments, Inc., NY)で下げた。DNAをエタノール沈殿させ、そして蒸留水の中で再溶解させた。

##### 抗原結合免疫吸着アッセイ(ELISA)

Johnsonら、Can. Res., 46, 850-857(1986)に実質的に記載の通りに調整したTAG-72抗原を、ポリアクリルアミド36元マイクロタイタプレート(Cytotech Laboratories, Inc., Chantilly, VA)のウェルの上に一夜乾燥させることで吸着させた。そのプレートをPBS中の1%のBSAで31℃で1時間ブロックし、次いで200 μlのPBS, 0.05%のツイーン50で3回洗った。25 μlの抗原抗体及び25 μlのビオチニル化(C49: 1/20,000希釈率の1 μg/mlの溶液)をウェルに加え、そしてそのプレートを31℃で30分インキュベートした。プレートに結合したTAG-72、ビオチニル化CC49、ストレプトアビジンアルカリホスファターゼの増幅、及び染色増幅は、最終抗体又はビオチニル化CC49がないように、しかもscFvによる結合を検出するのに十分なシグナルが得られるように実験的に決定した。陽性コントロールは5 μg/mlのCC49及び10 μg/mlのCC49Fabとした。陰性コントロールはPBS中の1%のBSA及び/又はB2Dとした。未結合のタンパク質を洗い流した。アルカリホスファターゼの結合された1:1000のホスホーストレプトアビジン50 μl(Southern Biotechnology Associates, Inc., Birmingham, AL)を加え、そしてそのプレートを31℃で30分インキュベートした。そのプレートを更に3回洗った。50 μlのパラニトロフェニルホスフェート溶液(Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc., Gaithersburg, MD)を加え、そして陽性反応を最低20分待たせた。scFv2結合の相対量マイクロプレートリーダー(MB

Secular Devices Corporation, Natick Park, CA)を用い104 ~ 450 nmでの光吸収スペクトルにより測定した。scFv2の場合は、黄色の同時低下を伴うビオチニル化CC49の割合の低下をもたらした。

#### SDS-PAGE及びウェスタンブロッティング

SDS-PAGE分析のためのサンプル (20  $\mu$ l) を、非還元型サンプル緩衝液 (Bio-Rad) (Integrated Separation Systems (ISS), Natick, MA) の中で5分間煮沸することにより調製し、そして0.4-20%勾配のポリアクリルアミド (Bio-Rad) にその製造者の仕様書 (ISS) に従って載せた。

電気泳動は、Mini 2-ゲル装置 (ISS) を用い、ゲル当たり55mAで、一定の電圧で約75分を行った。ゲルをタマゴゼンブリアントブルー R 250 (Bio-Rad, Richmond, CA) の中で少なくとも1時間染色し、次いで脱色した。分子重量標準は予め求められており (Mid Range kit, Diversified Biotech, Newton Center, MA)、そして下記のタンパク質を含んでいた: ホスホリラーゼB、グルタマールデヒドロゲナーゼ、オバルブミン、ラクトートデヒドロゲナーゼ、炭酸アンヒドラーゼ、ヨウラクトグロブリン及びナットクロームC。対照の分子量はそれぞれ92,000, 55,000, 43,000, 30,000, 29,000, 16,400及び12,400である。

ウェスタン分析を行うとき、デブリーゲートのゲルも移動した。電気泳動後、ゲルの一方を過酸バッファ (10.3Mのトリス-HCl, pH10.4) の中で15-20分平衡にした。Immobilon P-PVDF (ポリビニリデンジクロリン) 膜 (Millipore, Bedford, MA) をメタノールで2分脱脂し、そして水の中に2分浸した。その膜を次に陰極バッファ (1) の中で3分平衡にした。Millipore-SDS 溶液 (Millipore) を、ゲルの中のタンパク質をこの膜に転写するために用いた。一層の陽極バッファ (1) を陽極電極の中央に載せた。Pharmacia 394 電流のシートを陰極バッファ (1) の中に浸し、そしてその電極面の上に増幅剤に浸した。陰極バッファ (2) (25mMのトリス, pH10.4) の中に浸した膜の遠端を一枚の紙の上に載せた。次に濡れたPVDF膜を加え、平衡ゲルをその上に重ね、そして最後に陰極バッファ (40mMのグリシン中の25mMのトリスHCl, pH10.4) の中に浸した濾紙のシートを加えることによってサンドイッチを作った。転写は250mAの定電流 (初期電圧は8-20ボルトに調節した) を用いて30分で遂行された。

通常のプロトコールに従ったが、ただし陰極バッファ (1) として、0.1Mのクエン酸ナトリウム, pH 3.6を用いた。固分を 1.0Mのトリス-HCl, pH 9.0を用いてpH 7に中和した。ビオチニル化反応は下記の通りに設定した。FA10 (4  $\mu$ l) mg、水の中で 100  $\mu$ l) を 100  $\mu$ l の 0.1MのNa<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, pH 9.8と混合した。ビオチニル化 (アミノ-α-ブロン酸-N-ヒドロキシスクシニミドエステル (Biotin-X-NHS) (Calbiochem, La Jolla, CA) (1.5mg) を 0.5mlのジメチルスルホキシドの中に溶かした。Biotin-X-NHS 溶液 (20  $\mu$ l) を FA10 14溶液に加え、そして22℃で4時間反応させた。過剰のビオチン及び不純物を、Pharmacia Superose 12 HR10/30カラム (Pharmacia, NJ) を用いてゲル濾過により除去した。0.8  $\mu$ l / min の速度で、ビオチニル化 FA10 14は 16.8minのピークで洗脱した。このピークを凍結する部分をブールし、そして4℃で保存し、そして CC49、及び V<sub>H</sub> DHR により決定されるCC49イディオタイプを検出するのに用いた。

#### 電気泳動移動 (TEE)

電極 (pH) は、BioRad (Madison, WI) を介して入手できる PROTEIN-TITRA TEという名のコンピュータプログラムを用いて決定した。入力してある配列によるアミノ酸組成に基づき、Hに於いて調節が得られた。Cys残基は電荷に寄与するため、Cysについての計算はCに調整し、Hに於けるそれらは全てジスルフィド結合に関与するからである。

実験前にpIを、Isogen (アガロース 1EFブレーン、pH 3 ~ 10) (Bio-Rad products, Rockland, MA) を用いて決定した。BioRad Bio-phoresis 水平電気泳動セルを、IEFを行うのに用い、両者の製造者の仕様書に従った。電気泳動条件は、500ボルト (陽極)、20mAの電流及び10Wの定電電力とした。電気泳動は 90minで完了した。IEF溶液はBioRadより購入した。そのセットはフィコシアニン、ヨーカクトグロブリンB、牛炭酸アンヒドラーゼ、ヒト炭酸アンヒドラーゼ、馬イオグロビンヒトヘモグロビンA及びC、3レシナルクレチン及びナットクロームCを含み、それらのpI値は1.65, 5.10, 6.00, 6.50, 7.00, 7.10及び7.50, 7.80, 8.00及び8.20及び9.50である。ゲルを、PACにより供給された仕様書に従って染色及び脱色した。

#### CC49抗体の定量

ブロットした後、その膜を水の中で簡単にすすぎ、そして20mlのブロッキング溶液 (トリス緩衝食塩水 (TBS) の1%の牛血清アルブミン (BSA) (Sigma, St. Louis, MO) を含有する溶液の中に入れた。TBS はPierce Chemical (Rockford, IL) より、予備材料として購入し、500mlの水を加えたとき、その溶液は25mMのトリス、0.15Mの塩化ナトリウム溶液、pH 7.6を提供する。これらの膜を最少限1時間、室温でブロットし、そして20mlづつ 0.5%のソイーン20洗滌液 (TTBS) を用いて5分間を回した。TTBSを調製するには、0.5mlのソイーン20 (Sigma) を TBSのリッター当たり混合した。使用したブローブ抗体は20mlのビオチニル化 FA10 14溶液とした (10  $\mu$ g / 20mlの抗体バッファ)。抗体バッファは 100mlのTTBS当たり 1 g の BSAを加えることにより作った。所用温度で30-60分ブローブした後、その膜を上記の通りTTBSで3回洗った。

次に、その膜を室温において30-60分、洗液バッファ (1) で 1:500 希釈率のアルカリホスファターゼの結合されたストレプトアビジン (Southern Biotechnology Associates, Birmingham, AL) 20ml とインキュベートした。洗浄工程を上記の通り、この後繰り返した。発色反応の基は、炭酸炭酸アルカリバッファ (20ml) の中で2分洗った。このバッファは 0.1Mの炭酸水素ナトリウム、1 mMの MgCl<sub>2</sub> · H<sub>2</sub>O, pH 9.8とした。アルカリホスファターゼに於ける阻害を避けるため、ニトロブルー-テトラゾリウム (NBT) クロリド (Sigma) を70%のジメチルスルホキシドの中に溶かした。ニトロブルー-テトラゾリウム-3-インドールホスフェート (BCIP) (25mg, Sigma) を別に 100%のジメチルスルホキシドの中に溶かした。5-ブプロモ-4-クロロ-3-インドールホスフェート (BCIP) (25mg, Sigma) を別に 100%のジメチルスルホキシドの中に溶かした。これらの溶液も、Pierceよりウェスタン染色剤として市販されている。染色のため、それぞれ 120  $\mu$ l を上記のアルカリ溶液に加え、そして15分間反応させ、次いで発色液からそれらを水で洗い流した。

#### ビオチニル化, FA10 14

FA10 14は、CC49に対して特異的な、ATCC No. CRL10256として提供されているネズミの抗-イデオタイプ抗体 (IgG2a, Kアイソタイプ) である。FA10 14は Myogen Protein A アフィニティカラム (Yonkers, NY) を用いて調製した。弱

IgG, scFv2の種および分子量は、Fvを含む精製CC49抗体はすべて、混合している 1.3cm光路長の石英製キュベット (Hellma社) および Perkin-Elmer UV715 分光光度計SC20型を用いて、タンパク質溶液の 280nm波長の吸光度を測定して定量した。モル吸光係数 (E<sub>m</sub>) は、各抗体について、下記式を用いて算定した。

$$E_m = (Trp数) \times 5,500 + (Tyr数) \times 1,540 - ((Cys) 2数) \times 150 - (Pro数) \times 10$$

これらの値は、B. Ballan, Advances in Protein Chemistry, 17巻, 375 ~ 378 頁に記載されている情報に基づいている。

#### 両性液体クロマトグラフィー

CC49scFv2を精製するために行った両性液体クロマトグラフィーにはすべて、全体にチタンまたはチタノン製管を用いた HPLC システムを使用した。このシステムは、2150型HPLCポンプ、2122型検出器、270nmの検出光に設定された UV CORE 5 II 2238 型検出装置および2211型 LaserRac fraction collectorで構成されている。

#### サブユニットのF<sub>2</sub>による製造

ポリマーゼ連鎖反応 (PCR) はすべて、150  $\mu$ l グラム (pg) のプラスミド DNA (pSCFV2) ; 100ピコモルのプライマー; 1  $\mu$ l のPerkin-Elmer-Cetus社 (米国、コネティカット州、ノーウエーク所在の PCR) の Ampli-tagポリマーゼ; 10  $\mu$ l の 10mM dNTPおよび10  $\mu$ l の10 $\times$ 反応液 (両者ともに PCRに提供されている); ならびに合計容積を 100  $\mu$ l にするのに充分な水で構成された反応混合液で行った。PCR反応はメーカーが記載しているのとはほとんど同様に行われた。これらの反応は、Pfu 9600熱サイクルクーラー (thermocycler) を用いて36サイクルを行ったが、その1サイクルは、94℃で20-45秒間の DNAの解性; 52-60℃で 0.5-1.5分間のアニリングおよび72℃で 0.5-2.0分間の伸長で構成されている。オリゴヌクレオチドのプライマーは、Applied Biosystems社 (米国、カリフォルニア州、ホスター・シティ所在) の3330型もしくは 5610型 DNA合成器で合成し、次いで上記のようにして精製した。

#### リゲーション

100ngのベクター DNAおよび対応する1:1化学量論的当量のインサート DNAを用いるリゲーション反応を、Stratagene社（米国、カリフォルニア州、ラ・ホーヤ市）のT4 DNAリガーゼキットを用い、該メーカーの指示にしたがって行った。リゲーション反応物（全容積20 $\mu$ L）は最初18°Cでインキュベートし、次いで一夜4°Cまで徐々に冷却した。

#### 形質転換

形質転換は、100 $\mu$ LのStratagene社の大腸菌（E.coli）AG1コンピエント細胞（米国、カリフォルニア州、ラ・ホーヤ市）のStratagene社を用い、メーカーの指示によって行った。上記リゲーション反応物（1 $\mu$ L）を用いた。形質転換ステップの後、細胞は、混合を続けながらLBアブロス（LB）中で37°Cで1時間増殖させ、続いて、pSCFV100、pGL301もしくはpGL301Hに用いる20 $\mu$ g/mLのクロラムフェニコール含有（CAM20）ペリテラ板上にプレートし、またはアブロスにpGL301を含むクロラムフェニコール（CAM20）ペリテラ板上にプレートし、またはアブロスにpGL301を含むクロラムフェニコール（CAM20）ペリテラ板上にプレートし、100 $\mu$ g/mLアンピシリン（AMP）ペリテラ板上にプレートした（LB+AMP100）上にプレートした。

#### 大腸菌クロロンのスクリーニング

細胞アブロス（米国、ウィスコンシン州、マディソン市）のMagicミニプレップアブロスに製造キットを用いて、変異（selection pressure）を維持するため適切な変異を含むLBアブロス増殖物から分離した。このキットはメーカーの取扱い説明書にしたがって使用した。

#### アブロスの増殖

pGL301およびpGL301Hと命名された2種のアブロス、多量の一歩細胞培養を製造するために構築した。pGL301Hを含む変異株は、V<sub>1</sub>-L<sub>1</sub>V<sub>2</sub>-L<sub>1</sub>V<sub>3</sub>-L<sub>1</sub>V<sub>4</sub>で表すことができるポリペプチドを産生した。ここでV<sub>1</sub>とV<sub>2</sub>は、pSCFV100のC497HとC497Hの可変領域であり、およびリンカー（L）は、下記 SEQ ID NO: 5の配列を有する25個のアミノ酸のリンカーである。

Leu-Ser Ala Asp Asp Ala Lys Lys-Asp-Ala-Ala-Lys Lys Asp-Asp-Ala-Lys-

Lys-Asp-Ala-Ala-Lys-Lys-Asp-Lys

pGL301Hを含む変異株は、V<sub>1</sub>-L<sub>1</sub>V<sub>2</sub>-L<sub>1</sub>V<sub>3</sub>-L<sub>1</sub>V<sub>4</sub>で表すことができる

変化した。陽性プローブであり、かつBamHIおよびXbaIによる消化物由来の207bpの制限酵素断片（図8に示す）958-2165の塩基対（bp）を含むアブロスをpGL301Hと命名し、次いでC497Hに対するヌクレオチド配列を有するpGL301Hを構築するために選択した。XbaIとBamHIの制限酵素の間のポリリンカー領域中に存在するBsp177制限酵素シンドラクトレース位を除くためであった。このことは、Bsp177制限酵素が、構造体中に各変異V1位を配置するためにユニークである必要があるV<sub>1</sub>とV<sub>2</sub>の領域を除いて構築するための設計された。各V領域がC497HとXbaI部位に付加されると、C497Hは各場合に破壊されて、ユニーク断片に入ってくる次のBsp177位を形成した。

V<sub>1</sub>配列は、PCR増幅の標的としてpSCFV100を用い、オリゴの5' SCF1と5'オリゴSCF5によってPCRで増幅した。SCF1に対するDNA配列（SEQ ID NO: 10）とSCF5に対するDNA配列（SEQ ID NO: 11）は次のとおりである。

SCF1: 5'-TAA CTC GAG GTT CAG TCG CAG CAG-3'

SCF5: 5'-TAA GTC ACC ACC GCT TCG TGA GGA GAC GGT CAG TGA GGT-3'

下線を付けた部分はエンドヌクレアーゼ制限部位を示す。

増幅されたV<sub>1</sub> DNAを、4%のPAG、電気泳動、エタノールによる沈殿および20 $\mu$ L水への溶解によって増幅した。そのV<sub>1</sub>配列をXbaIとNheIの制限酵素で消化し、同じ制限酵素で消化され残ったpGL301Hベクターに対するインサートとして用いた。増幅のリゲーション反応を行い、次いで一歩分（4 $\mu$ L）を用いてコンピエント大腸菌AG1細胞に形質転換させた。形質転換された細胞を、LB AMP100ペリテラ板上にプレートした。C497Hインサートを含有していることを示す制限クロンをXbaIおよびXbaI消化スクリーニングから取出した。

United States Biochemical（USB）社（米国、オハイオ州クリーブランド市）のSequenase II、および配列決定プライマー-pGL301H（pGL301Hベクター中、XbaI部位から57bp上流においてアミノ酸化した21bpの配列決定プライマー）とC497Hを用いて、BFAの配列決定を行って、C497Hの配列を決定し、pGL301H中に正しいC497H配列を有するクロンを明らかにした。このプラスミドは

ポリペプチドを産生した。ここでV<sub>1</sub>とV<sub>2</sub>はC497Hの可変領域と可変領域の可変領域であり、およびは上記アミノ酸配列を有するポリペプチドリンカーである。

C497HとV<sub>1</sub>-L<sub>1</sub>V<sub>2</sub>-L<sub>1</sub>V<sub>3</sub>-L<sub>1</sub>V<sub>4</sub>（pGL301H）のヌクレオチド配列（SEQ ID NO: 12）とアミノ酸配列（SEQ ID NO: 13）を図8に示す。C497HとV<sub>1</sub>-L<sub>1</sub>V<sub>2</sub>-L<sub>1</sub>V<sub>3</sub>-L<sub>1</sub>V<sub>4</sub>（pGL301H）のヌクレオチド配列（SEQ ID NO: 13）およびアミノ酸配列（SEQ ID NO: 14）を図9に示す。

#### pGL301Hの構築

pGL301Hの構築を図8に示す。バシラス・リネニフォルミス（*Bacillus licheniformis*）のペニシリンナーゼP（penP）ターミナーターの配列を、XbaIおよびBamHIで45分間消化することによって、pSCFV100と命名されたプラスミドから取出し、電気泳動を行った後、4.5%ポリアクリルアミドゲルから切り取り、電気泳動させ、エタノールで沈殿させ、次に、同様に製造されたベクター-pGL301（米国、カリフォルニア州、サンディエゴ市）のInvitrogen社）中の同じ部位に挿入した。pSCFV100の製造手順は、1992年8月21日付け出版の米国特許第5,975,000号に記載されている。なおこの出願の開示事項は本願に適用するものである。一般に、pSCFV100は、penPプロモーターのヌクレオチド配列、207bp NcoI制限部位、C497H領域、Bsp177制限部位、25個のアミノ酸のリンカー、497bp XbaI制限部位、C497H領域、NheI制限部位、penPターミナーター、およびBamHI制限部位を含有している（図8参照）。このpenPプロモーターとpenPターミナーターは、Beresford, J. Biol. Chem., 258巻、11211-11215頁、1983年に記載されている。

上記のリゲーション反応物の一部（3 $\mu$ L）を、LB+AMP100ペリテラ板上にプレートし、次いで一夜増殖させたコンピエント大腸菌AG1細胞に形質転換するのを用いた。pSCFV100、インサートを含有するポテンシャルクロンを、Pharmacia社（米国、マリランド州、ガイサースバーグ市）のTT Quickprime<sup>TM</sup> DNA増幅キットと、Bulovelsa, Nucleic Acid Research, 17巻、452頁、1989年に記載されているマイクロ波によるコロニー増殖法とともに用いてスクリーニングした。プローブは、penP-XbaI-BamHIターミナーターフラグメント自体であるが、Quickprimeキットによって提供された指示によって製造した。

pGL301HとpGL301Hの両方を構築するときの出発点として使用した。使用した制限酵素のオリゴをここに示す。

pGL301H（SEQ ID NO: 12）およびC497H（SEQ ID NO: 13）のオリゴヌクレオチド配列は次のとおりである。

pGL301H（SEQ ID NO: 12）: 5'-TGC TGC GAT TAC GCA ACC TTA 3'

C497H（SEQ ID NO: 13）: 5'-GAT GAT TTT AAA TAC AAT GAG 3'

#### 表9例1 pGL301Hの構築

pGL301H（5 $\mu$ g）を産物物質として用い、これをRsaIおよびNheIで消化し、大きい方のベクターフラグメントを構築した。C497H挿入フラグメントは、5'オリゴとしてSCF5を用い、オリゴとしてSCF5を用い、PCRによって増幅した。SCF5のヌクレオチド配列（SEQ ID NO: 14）は下記のとおりである。

SCF5: 5'-TAA TGC GCA GAT GAC GCA AAG AAA GCA GCA CCA TTA AAA GAT

GCA AAA AAG GAT GAC GAC AAG AAA GAT GTC GTC GTC TGC CAG CAC

TCT-3'

またオリゴSCF5はリンカーのコーディング領域の一部（SEQ ID NO: 14のbp 6-76）を含有している。pSCFV100中のC497H領域でアミノ酸化するよう設計されたオリゴの部分は、SEQ ID NO: 14中のbp 77-90由来のものである。

下線を付けた配列はpGL301H中に相当する。得られたPCRインサートを増幅し、XbaIとNheIで消化し、次いでpGL301H（C497H）NheIベクターとのリゲーション反応に用いた（図7）。コンピエント大腸菌AG1細胞を、このリゲーション反応物（3 $\mu$ L）で形質転換を行うのを用い、LB+AMP100ペリテラ板上にプレートした。pGL301H生成物を示す正しいサイズのXbaI-NheIインサートを有する2個のクロンの配列をオリゴ増幅を用いて決定し、正しい配列（図7のヌクレオチド124-1543）を有する単一クロンをその後の構築に用いるのに適した。SCF5のヌクレオチド配列（SEQ ID NO: 15）は下記のとおりである。

SCF5: 5'-TGC ACT TTA TGT AAG ATG ATG T-3'

最終のリンカーV<sub>1</sub>サブユニット（bp1544-1665、図7）は、5'オリゴのSCF5と3'オリゴのSCF5を用い、PCRの標的としてpSCFV100を用いて製造

した。SCP7bのヌクレオチド配列(SEQ ID NO: 16) は下記のとおりである。

SCP7b: 5' -TAA TGC GCA GAT GAC GCA AAG AAA GCA GCA AAA GAT  
GCA AAA AAG GAT GAC GCG AAG AAA GAT CTT GAT ATT CTC ATG TCA CAG TTT  
CC

下線を付けたヌクレオチドは FspI 部位である。SCP8aのヌクレオチド配列(SEQ ID NO: 17) は下記のとおりである。

SCP8a: 5' -TAAA GGT AGC TTT TTA CTT AGC GAC  
CAG CTT GGT GGC-3'

下線を付けた最初の「A」は SbfI 部位に相当し、もう一つの「A」は AflII 部位に相当する。SCP7bのヌクレオチド8〜76はリンカーをコードし(図1のヌクレオチド134〜161)、一方V<sub>1</sub>にアニールするヌクレオチド77〜93は図1の161〜1635に相当する。プライマー SCP8aは、その5'末端の塩基4チール、NheI制限部位、終止コドン、AflII制限部位およびV<sub>1</sub>の最後の21個の塩基を含有している。FspIとNheIによる消化の後、この得られた42bpのインサートを複製して精製pSL301HLTベクターのNheIとEco47IIIの部位に連結し、最終的なクローンをNheIとItoIでスクリーニングし、正しい大きさのインサートが確認されたpSL301HLT(+)とSCP7b配列が決定されて、pSL301HLT中に新たに挿入された配列が確認された。そのヌクレオチド配列(SEQ ID NO: 18) は下記のとおりである。

48LF82 (-): 5' -CTG CTC GTA CCA GCG CAA G-3'

プラスミドpSL301HLTをNheIおよびItoIで消化し、精製し、得られた117bpのV<sub>1</sub>リンカー-V<sub>2</sub>リンカー-V<sub>3</sub>セグメントをpSCFV CHMに連結してp49LHLRを構築した。なおこのpSCFV CHMは同じ細胞株系で構築された最大のV<sub>1</sub>のフラグメントを構築したものである。そのリゲーション反応混合物(4μL、5分)を用いてコンピテント大腸菌AG1細胞(Stralagene社)を形質転換し、LB/CA/20C 変性プレートにプレートした。正しい制限酵素地図を有するプラスミドを含有する単クローンを、p49LHLRを含有させるために選択した。p49LHLRは、CC49多価一本鎖抗体 scFv2: V<sub>1</sub>-L<sub>1</sub>-V<sub>2</sub>-L<sub>1</sub>-V<sub>3</sub>またはCC49scFv2 (L<sub>1</sub>H<sub>1</sub>)のpenPプロモーターとヌクレオチド配列を含有している。

りは次のステップで修正され、オリゴSCP6C (SEQ ID NO: 21) の末端に5塩基の欠失を補正することによってpSL301HLTを製造した。

SCP6C: 5' -TAAAGGCTGATGATGCTAAGAGGACCCGCAAAAA  
GGACGACGCAAAAAAGATGATGCAAGAAAGATGCTCC  
AGGCTGATGCTGACGACCTCTCAC-3'

SCP6C中の下線を付けた配列はEco47III部位に相当する。PCRにおいて、SCP6Cは5'オリゴとして用いられ一方SCP16A3'オリゴとして用いられ、リンカー-CC49V<sub>2</sub>セグメントが生成する。SCP16のヌクレオチド配列(SEQ ID NO: 22) は下記のとおりである。

SCP16: 5' -TTC TGC TAG CTT TTT ATG AGC AEA GCG TGA  
CTG AGG TTT 3'

SCP16中の下線を付けた配列は図6のヌクレオチド1958〜1963に見られるNheI部位に相当する。この場合、PCRインサートはNheIだけで消化され、次に複製される。ベクター(pSL301HLT)はEco47III部位(先に形成されている)およびNheI部位で消化され、次に複製された。そのインサートとベクターは連結され、その一部分(8μL)を使用してコンピテント E. coli AG1細胞を形質転換した。この形質転換細胞をLB-AMP100プレート上にプレートし、次に候補的クローンをNheIとItoIでスクリーニングした。正しい大きさのDNAを有する3個のクローンを得た。これらのクローンのうちの2個は、オリゴ49VLCOR3(+)およびSCP16を用いて配列を決定した。そのヌクレオチド配列(49VLCOR3(+))のSEQ ID NO: 23) は下記のとおりである。

49VLCOR3 (+): 5' CAG CAG TAT TAT ACC TAT-3'

正しい配列を有する一つのクローンが得られ、そして図6のヌクレオチド1533〜1963からの配列が確認され、正しいpSL301HLRクローンを示した。

大腸菌中で発現させるのに用いる最終的なプラスミドp49LHLRを製造するために、pSL301HLT(5μg)をNheIとItoIで消化し、次にV<sub>1</sub>-L<sub>1</sub>-V<sub>2</sub>-L<sub>1</sub>-V<sub>3</sub>配列を含有する小さい方のインサートを精製した。この断片を、pSCFV UHN(5μg)をItoIとNheIで消化して得た大きい方のベクターフラグメントの精製物と連結した。上記制限酵素混合物の一部(4μL)を使ってコンピテント大腸菌AG1

#### 実施例2: p49LHLRの構築

p49LHLRの構築を図10に図式的に示す。リンカーV<sub>1</sub>のサブユニットを5'オリゴのSCP7bと3'オリゴのSCP9で製造した。

SCP9: 5' -TAA AGC TAC CAC CAA GCG CTT AGT TTC  
AGC ACC AGC TTT GTC CCA G-3'

SCP7bオリゴ(ヌクレオチド8〜76)は図6のリンカーをコードし(ヌクレオチド1124〜1192に相当する)および図6のV<sub>1</sub>のヌクレオチド1193〜1215に相当する。PCRに対するpSCFV CHM(ヌクレオチド77〜93)にアニールした。

SCP9は、NheI部位(第一の下線を付けたヌクレオチド)とEco47III部位(第二の下線を付けたヌクレオチド)を有し、これらの部位は次のV<sub>1</sub>領域を有するためのpSL301HLRを作るのに必要な制限部位である。SCP9のヌクレオチド18〜28は図6のヌクレオチド1532〜1537(リンカーの最初の2個のブレンチンコードしている)に相当し、一方ヌクレオチド29〜46は、PCRにおけるSCP6(SEQ ID NO: 19)のアニール領域である図9に示すヌクレオチド1508〜1531に相当する。プラスミドpSL301HLTをEco47IIIとNheIで消化し、そしてその大きい方のベクターフラグメントは精製して、予めFspIとNheIで処理され精製された、PCRからのリンカー-CC49V<sub>2</sub>DNAインサートと連結させる。その連結混合物(3μL)を用いて大腸菌AG1コンピテント細胞を形質転換し、次に正しいNheI-ItoIの大きなフラグメントを有する一つのコロニーの配列をオリゴVLCOR3を用いて決定した。そのヌクレオチド配列(SEQ ID NO: 20) は下記のとおりである。

5' TTG ATC ACC AAG TGA CTT TAC G-3'

配列決定の結果は、得られたpSL301HLRクローン中にPCRの誤りまたは欠失があるということを示した。図6にみられるヌクレオチド1533〜1537に相当する5塩基の塩基の欠失がみとめられ、そして下であるべきはずのヌクレオチド1531はTAAE列のデータから確認したところ実際にはGであった。得られた配列は、

5' ...CAAGCGCTT...であった。

この下線を付けた配列は偶然にEco47III部位を形成した。図6のAGGCTTの配列はヌクレオチド1530、1531、1532、1538、1539および1540に相当する。このオリ

細胞を形質転換した。得られた形質転換細胞をLB-CA200プレート上にプレートし、次にp49LHLRに対する代表的なクローンを、正しい制限酵素地図(図10参照)およびTAA-72に対する生物活性に基づいて選択した。

#### 実施例3: CC49 scFv2のLHLRとLHLRが共有結合した二量体の精製

CC49の共有結合した一本鎖二量体(scFv2)の精製を行うために、大腸菌のペリプラズマ膜抽出物の成分を、p49LHLRとp49LHLRの両方の一価抗体から精製した。混合物を250μLづつの4部分に分割し、Sorvall GS-5ロータで10分間5000rpmで遠心分離した。ペレット化した細胞を洗浄し、30mM NaClを含有する10mMトリス-HCl pH 7.3からなる100μL中に再懸濁させた。細胞を再びペレット化し、合計100mLの50mMトリス-HCl pH 3.5で洗浄し、そして一つのチューブにブールした。このチューブに、40w/v%のスクロースを含有する30mMトリス-HCl pH 7.3(100mL)および10mM EDTA pH 7.5(2.0mL)を添加した。得られた混合物を、時々振盪しながら、室温に10分間保持した。高活性細胞(25% viable cells)を精製するようにしてペレット化した。次のステップでショックを与えて、該ペレットを20mLの水(0.5mM NaCl)中に速やかに懸濁させ、次に時々振盪しながら水上に10分間保持した。その細胞を精製するようにしてペレット化し、大腸菌の表面膜抽出物の成分を含有する上清を、0.2μmのNalge社(米国、ニューヨーク州、ロチェスター所在)の透過膜で濾過することによってさらに精製し、次にAmicon社(米国、マサチューセッツ州、ダンバース所在)のCentricon 30およびCentricon 30で1.0mLより小さい容積まで濃縮した。

p49LHLRまたはp49LHLRのクローン由来の表面膜抽出物のシェケット (shearable)を、Pharmacia社(米国、ニュージャージー州、ピスカタウェイ所在)のSuperdex 75 HX 10/30 BPLカラム(予めPBSで平衡化させたもの)に注入した。結合ELISA法で測定する場合、問題の生成物は0.5μL/分の流速で2〜24分間洗脱させた。活性成分をブールし、次に還元し、次に、システム2500 Microdialyzer Unit(Pierce Chemical社)を用い、緩衝液を3〜4回交換しながら8000MWカットオフ膜を使用して、20mMトリス-HCl pH 7.6に於いて一度透析を行った。その試料をPharmacia社のHeparin 5 μm L/Aニオン交換HPLCカラムに注射した。緩衝液として20mMトリス-HCl pH 7.6を用い、濃縮液として



て20Mトリス-HCl pH 7.6に0.5M NaCl を含いる勾配プログラムを、1.5ml/mlの流量で使用した。問題の生成物は、該勾配1154分まで移動する場合、各々3〜4分間カラムから放出された。この時点の両方の、二つの SDS-PAGEゲルによる分析で、一方のゲルはクローミングリアントブルー3250で染色し、他方のゲルはウエスタンブロッティング試薬としてビオチニル化 EITD 14を使用しに移動されたが、scfv2(LHLHまたはLHLH)の種の計算分子量の平均バッチが、58,235ダルトンの位置に出現した。活性画分は各場合分離し、50mM MES pH 5.8に対して一度透析し、次いで Pharmacia社のMono S HR 5/5カチオン交換カラムに注射した。この種別人サマツからの画分の二つの画分のうち、SEC TAG はおよび ELISA法で測定する場合、勾配法の効果が開始される直前に放出された。したがってこれらの画分は両方ともカラムに結合してはいなかったわけである。次いで画分5と6はさらに精製するためにプールした。

Mono Qカラムを活性KroS 5画分について再度使用したが使用した緩衝液は20mMトリス-HCl pH 8.0であり、流量は 0.5ml/分に低下させた。生成物はカラムとの結合なしで放出されたが、Mono Sに吸着している不純物がわずかにあり、したがって分離は5〜6分間であった。この処理を行った後、生成物は均質であり以後の特性決定のために貯蔵した。

#### 等電点電気泳動

諸生物の等電点 (pI) は DEXSTAR社 (米国、ウスケンシン州、マディソン所在) のコンピュータプログラム Protein-Liteを使用しして予測した。アミノ酸組成、およびpI値に基づいて計算した。

試験では、pIは、PNC Bioproducts社 (米国、メーン州、ロックランド所在) のLysnel IEPプリントアウト装置3〜10を使用しして測定した。上記IEPを実行するために、Biorad社 (米国、カリフォルニア州、リッチモンド所在) の電気泳動装置を用い、上記同メーカーの指示にしたがって使用した。その電気泳動の条件は、20mAで500V (設定) および一定電力の10Wであった。等電点電気泳動は30分間で完了した。Biorad社のIEP標準品は、フィコシアニン、グロブリン、ウシカルボニクタンヒドラーゼ、ヒトカルボニクタンヒドラーゼ、ウミオグロブリン、ヒトヘモグロビンAとC、3種のヒラマシタンおよびシクロム

Cが含有され、pI値はそれぞれ4.55、5.10、6.00、6.50、7.00、7.50、7.8、8.0、8.20 および 9.0であった。ゲルは PNCの指示にしたがって染色し染色した。DEXSTAR プログラムによって両方の scfv2の種のpI値として 5.1の値が予測された。純品の生成物に対し単一のバンドがゲル上に、両者のpI値の 6.5の位置にみとめられた。

IgG、scfv2 (LHLHおよびLHLH) のような糖鎖0.49kDaは、280nmは長光の吸光度を分光学的に測定することによって定量化した。モル吸光係数値は、各々、先に引用した Wellawellの式を用いて測定した。

そのアミノ酸組成に基づいて、CC49IgG、CC49scfv2(LHLH)、CC49 scfv2(LHLH)およびCC49scfv2のE<sub>280nm</sub> (280nm)値はそれぞれ 1.49、1.85、1.85 および1.71であった。

#### 免疫試験

CC49scfv2の種のLHLHとLHLHの相対活性を、IgGおよびOJ細胞にELISAペプチドを有する平皿体scfv2と比較した。

パーセント競合 (percent competition) を下記式によって ELISAのデータから求めた。

$$\text{ゼロ競合} = \frac{\text{試料の吸光度 (OD 405-450nm)} \times 100}{\text{ゼロ競合} - 100\% \text{競合}}$$

「ゼロ競合 (zero competition)」値は、1号 BSAをビオチニル化 (49 (8×10〜14モル) と1:1比率で混合して測定し、一方 100%競合はビオチニル化 CC49IgGと混合した CC49IgGの5 μg/ml試料に基づいた値である。これらのデータは図11に示す。試料の吸光度値は 400nm〜450nmで測定した。3回の試料取りの平均値を使用した。最初に試料 (25 μl) を、TAG-72でコートしたマイクロウェルプレートに、1.0×10<sup>10</sup> モルの結合部位/mlで塗布した。ビオチニル化CC49 (4 μg/ml 1:1:20,000に希釈、25 μl 使用) で試料を1/2濃度で希釈した。連続希釈法 (1:2) を行った。両方の影響の scfv2は IgGには等しい (図11参照)。別の試験で、CC49scfv2平皿体とPabフラグメントと比較した。両者は一様であるが、これらは TAG-72に対する結合アフィニティ、が等しいことを示した。これらの結果は、共有結合の二量体の両者の形質は、二つの充分に

機能的な抗原結合部位をもっていることを示している。これは、単量体の値に比べて、IgGについてみられるのと同じ結合力の増大である。

またこれらのデータは、scfv2分子が、その CC49IgGの値と同様に、免疫治療用途の候補であり、毛細血管透過性の増大および一時的な生体分布薬物動態の利点を有することを示している。この利点によって、既存の 20分子に比べて、本発明の化合物は多数回注射することができ、かつ副作用に用いる免疫療法において、副作用を低くすることができる。

本発明の他の実施形態は、本明細書を検討するかまたは本願に開示されている説明を参照することから、当該技術分野の当業者にとって明らかになるであろう。本明細書と実施例は開示だけを目的とするもので、本発明の範囲を限定する意図は以下の請求の範囲によって示される。

以上

#### 請求の範囲

1. 2本以上の一本鎖抗体フラグメントを含んで成る、各フラグメントが抗原に対する親和性を有しており、ここでそのフラグメントは第一のペプチドリンカーを介して共有結合されており、この第一のペプチドリンカーが下記のアミノ酸配列

Leu Ser Ala Asp Asp Ala Lys Lys Asp Ala Ala Lys Lys Asp Asp Ala Lys Lys Asp Asp Ala Lys Lys Asp Leu

を有し、

そして各フラグメントは:

- (a) 経膜可変ドメインを含んで成る第一ポリペプチド;
- (b) 重鎖可変ドメインを含んで成る第二ポリペプチド; 及び
- (c) この第一と第二のポリペプチドを機能的な結合性成分へと過剰にさせる

第二のペプチドリンカー:

を含んで成る、多価の一本鎖抗体。

2. 前記経膜可変領域が下記の配列

Asp Ile Val Met Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Pro Val Ser Val  
Gly Glu Lys Val Thr Leu Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu  
Tyr Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys  
Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Ala Arg  
Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr  
Asp Phe Thr Leu Ser Ile Ser Ser Val Lys Thr Glu Asp Leu Ala  
Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly  
Ala Gly Thr Lys Leu Val Leu Lys

と実質的に同じアミノ酸配列を有しており、そして前記経膜可変領域が下記の配列

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Asp Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly  
Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr  
Asp Ala Ala Ile His Trp Val Lys Gln Asn Pro Glu Gln Gly Leu  
Glu Trp Ile Gly Tyr Phe Ser Pro Gly Asn Asp Asp Phe Lys Tyr

Asn Glu Arg Phe Lys Gly Lys Ala Thr Ser Thr Ala Asp Lys Ser  
Ser Ser Thr Ala Tyr Val Glu Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp  
Ser Ala Val Tyr Phe Cys Thr Arg Ser Leu Asn Met Ala Tyr Trp  
Gly Cln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser

と実質的に同じアミノ酸配列を示している。請求項1記載の多価の一本鎖状体。  
5. 前記第一と第二のペプチドリンカーが実質的に同じアミノ酸配列を有する、請求項1記載の多価の一本鎖状体。

4. 多価の一本鎖状体をコードする DNA配列であって、この多価の一本鎖状体  
が2本以上の一本鎖状体フラグメントを含んで成り、各フラグメントが両端に對  
する糖和基を有しており、ここでそれぞれのフラグメントは第一のペプチドリンカ  
ーを介して共有結合されており、そして各フラグメントは：

- (a) 糖鎖可変ドメインを含んで成る第一ポリペプチド；
- (b) 糖鎖可変ドメインを含んで成る第二ポリペプチド；及び
- (c) この第一と第二のポリペプチドを特異的な結合性成分へと連結せしめる

第二のペプチドリンカー；

を含んで成る、DNA配列。

5. 前記第一ポリペプチドをコードする配列が下記の配列：

GAC ATT CTC ATG TCA CAG TCT CCA TCC TCC CTA CCT GTG TCA  
CTT GCC GAG AAG GTT ACT TTG AGC TGC AAG TCC ACT CAG AGC  
CTT TCA TAT AGT GGT AAT CAA AAG AAC TAC TTG GCC TCG TAC  
CAC CAG AAA CCA GGG CAG TCT CCT AAA CTG CTG ATT CAC TGG  
GCA TCC GGT AGC CAA TCT GGU GTC CCT GAT CCG TTC ACA GGC  
AGT GGA TCT GGG ACA CAT TTC ATT CTC TCC ATC AGC AGT GTG  
AAG ACT GAA GAC CTG GCA GGT TAT TAC TGT UAG CAG TAT TAT  
AGC TAT CCC CTC ACG TTC GGT GCT GGG ACC AAG CTG GTG CTG  
AAG

と実質的に同じであり、そして前記第二ポリペプチドをコードする配列が下記の  
配列：

GAC GTT CAG TTC CAG CAG TCT GAC GCT GAG TTC GTG AAA CCT  
GGG GCT TCA CTG AAG ATT TCC TGC AAG GCT TCT GGC TAC ACC  
TTC ACT GAC CAT GCA ATT CAC TCG GTG AAA CAG AAC CXT GAA  
CAC CCC CTG CAA TCG ATT GGA TAT TTT TCT CCC GGA AAT GAT  
GAT TTT AAA TAC AAT GAG AGG TTC AAG GGC AAC CCC ACA CTG  
ACT GCA GAC AAA TCC TCC AGC ACT CCC TAC GTG CAG CTC AAC  
AGC CTG ACA TCT GAG GAT TCT GCA GTG TAT TTC TGT ACA AGA  
TCC CTG AAT ATG GGC TAC TCG GGT CAA GGA ACC TCA CTC ACC  
GTC TCC TCA

と実質的に同じである、請求項1記載の DNA配列。